



Physico-chimie des lipopolysaccharides et réponse inflammatoire : rôle des lipoprotéines

Wahib Sali

► To cite this version:

Wahib Sali. Physico-chimie des lipopolysaccharides et réponse inflammatoire : rôle des lipoprotéines. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS051 . tel-01134149

HAL Id: tel-01134149

<https://theses.hal.science/tel-01134149>

Submitted on 23 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

*Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne*

Disciplines : Sciences de la Vie

Spécialités : Biochimie, lipidomique et inflammation

Soutenue publiquement le 16 décembre 2014

par

Wahib SALI

PHYSICO-CHIMIE DES LIPOPOLYSACCHARIDES & REPONSE INFLAMMATOIRE *ROLE DES LIPOPROTEINES*

JURY

Pr David MASSON

PU-PH

Président
Examineur

Université Bourgogne- CHU Dijon

Dr Sophie VISVIKIS-SIEST

Directeur de Recherche

Rapporteur

INSERM U1122, Nancy

Dr Catherine DESRUMAUX

Chargé de Recherche

Rapporteur

INSERM/EPHE U710, Montpellier

Dr Maryse GUERIN

Directeur de Recherche

Examineur

INSERM U1166, Paris

Dr Laurent LAGROST

Directeur de Recherche

Directeur de thèse

INSERM U866-LNC, Dijon

Dr Thomas GAUTIER

Chargé de Recherche

Co-encadrant de thèse

INSERM U866-LNC, Dijon

Cette thèse a été réalisée au sein du Centre de Recherche Inserm U866 "Lipides, Nutrition, Cancer",

À la Faculté de Médecine de Dijon, au sein de l'équipe n°8 "Protéines de transfert des lipides et métabolisme des lipoprotéines",

Sous contrat doctoral du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche avec l'université de Bourgogne.

**À Madame le Docteur Catherine DESRUMAUX,
À Madame le Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST,
À Madame le Docteur Maryse GUERIN,
À Monsieur le Professeur David MASSON,**

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je les prie de recevoir ma gratitude et mon profond respect.

**À Monsieur le Professeur Luc ROCHETTE,
À Monsieur le Professeur Michel LAGARDE,**

Qui m'ont fait l'honneur d'être mon comité de suivi de thèse doctorale. Je leur adresse ma reconnaissance et ma grande considération.

À Monsieur le Docteur Laurent LAGROST,

Qui m'a accueilli dans son équipe de recherche et a dirigé cette thèse. Je le remercie pour cela et lui exprime aussi ma reconnaissance pour le temps consacré à ce travail, pour m'avoir permis de poursuivre le double cursus Master 2 Administration des Entreprises (MAE)/Doctorat, ainsi que pour la liberté et les moyens qu'il a mis à ma disposition pour mener mes recherches.

À Monsieur le Docteur Thomas GAUTIER

Qui m'a encadré, m'a formé à de nombreuses techniques et a consacré du temps à ce travail. Je lui adresse mes profonds remerciements.

À Monsieur le Docteur Thierry RIGAUD,

Qui m'a suivi dans les étapes les plus éprouvantes de ma thèse doctorale, m'a apporté ses précieux conseils, son soutien et ses encouragements. Je le remercie chaleureusement.

À Monsieur le Professeur Alain PUGIN,

Qui m'a donné envie de faire de la recherche au fil de ses enseignements et m'a encouragé dans ce sens tout au long de mon cursus universitaire. Je le remercie chaleureusement pour tout cela et pour sa grande humanité.

À Monsieur le Docteur Jean-Paul PAIS DE BARROS,

À Madame le Docteur Anne ATHIAS,

Qui m'ont accueilli dans la bonne humeur au sein de l'IFR 100 Santé STIC et la gentillesse, ont été des partenaires de travail avec qui j'ai passé des journées de travail édifiantes. Je les remercie pour cela, ainsi que pour leur disponibilité.

À Monsieur le Docteur Stéphane MANDARD,

Qui a été un enseignant remarquable tout au long de mon parcours universitaire, un collègue et ami. Je le remercie chaleureusement pour cela et pour avoir contribué à me donner foi en mes capacités.

À Madame Naig LE GUERN,

À Monsieur Jérôme LABBE,

À Monsieur le Docteur Vincent DUHERON,

À Monsieur Guillaume MAQUART,

Qui ont été des collègues et des amis remarquables. Je leur exprime mon affection et les remercie pour les rires, pour les discussions de toute sorte, pour les encouragements et pour leur profonde humanité.

**À Monsieur le Docteur Denis BLACHE,
À Madame le Docteur Valérie DECKERT,
À Monsieur le Docteur Jacques GROBER,
À Monsieur le Docteur David MASSON,
À Madame le Docteur Stéphanie LEMAIRE-EWING,
À Monsieur le Docteur Denis CHAUMONT,
À Monsieur le Professeur Eric LESNIEWSKA,
À Madame le Docteur Anabelle SEQUEIRA-LEGRAND,
À Monsieur André BOUCHOT,
À Monsieur Benoit GASQUET,
À Monsieur le Docteur Mathieu MOREAU,
À Monsieur le Docteur Franck DENAT,**

Qui ont été des collègues agréables et disponibles. Je les remercie et leur souhaite une bonne continuation.

À Monsieur le Docteur Fabrice HERVE,

Qui m'a donné la chance de rejoindre la première promotion MAE/Doctorat de l'université de Bourgogne/IAE, qui a dirigé ma formation MAE en double cursus avec conciliation pour mes obligations de doctorant. Je le remercie profondément pour sa confiance et son soutien.

À tous mes collègues de travail de l'équipe "Protéines de Transfert des lipides et métabolisme des lipoprotéines" et du Centre de Recherche Inserm UMR866

À ma famille, à mes amis,

Les mots sont impuissants. Merci pour tout.

À ceux qui étaient et qui ne sont plus,

Qui pourtant m'ont construit par leur amour, leur exemple et leurs enseignements. Je ne vous oublie pas. Je vous remercie où que vous soyez.

*A mes parents,
A mes sœurs,
A celui qui toujours veille,*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Liste des publications et des communications

Liste des illustrations

Liste des abréviations

AVANT-PROPOS **p1**

A. Le LipoPolySaccharide (LPS), composante étiologique de maladies non infectieuses et infectieuses.....p2

B. Le LPS, une molécule méconnue au centre du modèle expérimental d'étude du syndrome de réponse inflammatoire systémique et de l'inflammation.....p3

INTRODUCTION GENERALE **p6**

A. L'endotoxémie : LPS, signalisation et modulateurs de l'inflammation.....p7

B. L'élimination du LPS : l'autre face du transport inverse du cholestérol.....p7

I. Les lipoprotéines : ces complexes supramoléculaires de compositions variées p8

II. Le métabolisme des lipides et des lipoprotéines.....p10

1. La voie d'apport des lipides exogènes ou voie entéro-hépatique (Voie 1).....p11

2. La voie d'apport des lipides endogènes (Voie 2).....p11

3. Le transport inverse du cholestérol (Voie 3).....p11

III. La famille des protéines LT/LBP : entre métabolisme des lipoprotéines et immunité innée.....p12

A. Les LipoPolySaccharides (LPS).....p16

I. Le LPS dans l'Histoire de la Science.....p16

II. Localisation des LPS.....p17

III. Structure des LPS.....p18

1. Structure de la chaîne O ou antigène O.....p19

2. Structure du noyau.....p20

3. Structure du lipide A.....p20

IV. Biosynthèse des LPS.....p21

1. Biosynthèse du lipide A.....p21

a. Formation du lipide IV_A.....p21

b. Ajout des premiers sucres du noyau.....p22

c. Fin de l'acylation du lipide A.....p22

2. Finalisation de la biosynthèse du noyau et transfert du LPS "*rough*".....p22

3. Biosynthèse de la chaîne O.....p23

a. Synthèse de monosaccharides liés à un Nucléotide DiPhosphate (NDP).....p24

b. Formation des sous-unités O à partir des nucléotides.....p24

c. Polymérisation des sous-unités osidiques et transfert vers la face périplasmique de la membrane interne.....p24

4. Fusion de la chaîne O sur le complexe moléculaire noyau-lipide A.....p25

5. Transfert des LPS vers la face extracellulaire de la membrane externe.....p26

6. Variations inter-espèces et modifications de structure des LPS.....p27

a. Variations du lipide A.....p28

b. Variations de la chaîne O.....p30

c. Implication de la chaîne O dans l'interaction du LPS avec le système du complément.....p31

i. La voie classique.....p32

ii. La voie alterne.....p32

iii. La voie des lectines.....p33

V. Agrégabilité des LPS.....	p35
1. Introduction aux cristaux liquides ou mésogènes.....	p35
2. Deux terminologies : cristaux liquides/état cristal liquide versus mésogène/mésophase.....	p36
3. Les grandes familles de mésogènes : thermotropes et lyotropes.....	p36
4. Du mésogène au complexe supramoléculaire.....	p37
a. Dissymétrie de forme.....	p37
b. Dissymétrie de propriétés physico-chimiques.....	p38
c. Impact de la nature du solvant et de la concentration de la molécule amphiphile sur son organisation supramoléculaire.....	p38
5. Un cas concret de mésogène lyotrope pourvu d'une structure amphiphile : le LPS.....	p39
B. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES D'ETUDE DES LPS.....	p42
I. Méthodes d'extraction des LPS.....	p42
1. Extraction au phénol chaud/eau.....	p42
2. Extraction au phénol/chloroforme/éther de pétrole.....	p43
II. Méthodes de purification des LPS.....	p44
III. Méthodes de pré-analyse structurale des LPS.....	p45
1. Détermination de l'hétérogénéité de l'extrait de LPS.....	p45
2. Sélection d'un chémotype de LPS.....	p46
3. Clivage des LPS : la chaîne polysaccharidique et le lipide A.....	p46
IV. Méthodes d'analyse massique ou structurale des LPS par spectrométrie de masse...	p47
1. Les sources.....	p49
2. Les analyseurs.....	p50
3. Historique des analyses de LPS par spectrométrie de masse.....	p52
V. Méthodes d'analyse structurale des complexes supramoléculaires de LPS.....	p53

1. Diffusion Dynamique de la Lumière.....	p54
2. Microscopie Electronique à Transmission.....	p57
3. Microscopie à Force Atomique.....	p59
4. Zêtamétrie.....	p61
5. Fluorescence à l'état stable de sondes pyrène.....	p65
 VI. Méthode de mesure de l'activité biologique des LPS : test LAL versus stimulation macrophagique par les LPS.....	p67
1. Test LAL.....	p67
2. Stimulation macrophagique par les LPS.....	p69
 VII. Méthodes de dosage des molécules de LPS.....	p71
1. Dosage de l'acide 3-hydroxymyristique (C14-3OH).....	p71
2. Dosage de l'acide 3-desoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo).....	p72
3. Dosage basé sur le shift de l'absorbance d'un colorant.....	p72
 C. ENDOTOXEMIE.....	p73
 I. Endotoxémie : signalisations cellulaires et effets physiopathologiques.....	p73
1. Prise en charge des LPS circulants et transport à la surface des cellules.....	p74
a. Voie dépendante de LBP/CD14.....	p75
b. Voie indépendante de LBP/CD14.....	p75
c. Voie dépendante de LBP et indépendante de CD14.....	p76
2. Formation du complexe hétérodimérique [(TLR4-MD-2)-LPS].....	p78
3. Cascade de signalisation intracellulaire.....	p79
a. La voie de signalisation dépendante de MyD88.....	p79
b. La voie de signalisation dépendante de TRIF.....	p80
4. Cascade des effets physiopathologiques.....	p83
a. Mise en place de l'état inflammatoire.....	p83
b. Perte de la vasomotricité et de l'intégrité du système cardio-vasculaire.....	p84
c. Mise en place d'une Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD).....	p84
d. Choc endotoxinique.....	p85

II. Relation structure-agrégabilité-activité biologique des LPS.....	p87
1. Structure chimique du lipide A.....	p87
2. Etat d'agrégation des LPS.....	p89

D. TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL ET DU LPS.....p91

I. Transport inverse du cholestérol.....	p91
1. Amorçage et prise en charge de l'excès de cholestérol cellulaire périphérique par les lipoprotéines HDL.....	p92
2. Maturation et remodelage des lipoprotéines HDL.....	p93
a. Intervention de l'enzyme Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT).....	p93
b. Intervention combinée de la Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol (ou <i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i> , CETP) de la lipase hépatique (LH) et de la lipase endothéliale (LE).....	p94
c. Intervention de la Protéine de Transfert des Phospholipides (ou <i>PhosphoLipid Transfer Protein</i> , PLTP).....	p95
3. Captage hépatique du cholestérol et son excrétion biliaire.....	p96
II. Transport inverse du LPS.....	p98
1. Implication des protéines LT/LBP dans le métabolisme des LPS.....	p98
a. la BPI.....	p99
<i>i. Structure et localisation.....</i>	p99
<i>ii. Fonction.....</i>	p99
b. la LBP.....	p100
<i>i. Structure et localisation.....</i>	p100
<i>ii. Fonction.....</i>	p101
c. la CETP.....	p101
<i>i. Structure et localisation.....</i>	p101
<i>ii. Fonction.....</i>	p102
d. La PLTP : comparaison avec les autres protéines LT/LBP.....	p102
<i>i. Structure et localisation.....</i>	p102
<i>ii. Fonction.....</i>	p103

2. Inactivation des LPS par les lipoprotéines.....	p105
a. Mécanismes moléculaires d'inactivation des LPS par les lipoprotéines.....	p106
b. Effets des lipoprotéines sur le métabolisme des LPS.....	p107
<i>i. Effet inhibiteur sur l'activation du système du complément.....</i>	<i>p107</i>
<i>ii. Effet inhibiteur sur l'activation des cellules de l'immunité innée.....</i>	<i>p107</i>
<i>iii. Effet favorisant la clairance plasmatique des LPS.....</i>	<i>p108</i>
c. Impacts des lipoprotéines sur les effets physiopathologiques induits par les LPS.....	p109
<i>i. Impact des lipoprotéines sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par les LPS.....</i>	<i>p109</i>
<i>ii. Impact des lipoprotéines sur les symptômes induits par les LPS.....</i>	<i>p110</i>
<i>iii. Impact des lipoprotéines sur la mortalité induite par les LPS.....</i>	<i>p111</i>
3. Détoxification et élimination des LPS par la fonction hépato-biliaire.....	p111
III. Interactions entre le transport inverse du cholestérol et le transport inverse du LPS.....	p113
1. Effets de l'endotoxémie sur les transporteurs.....	p113
2. Effets de l'endotoxémie sur l'assimilation cellulaire du cholestérol.....	p113
3. Effets de l'endotoxémie sur les lipoprotéines HDL.....	p113
4. Effets de l'endotoxémie sur le métabolisme hépatique du cholestérol.....	p114
5. Effets du transport inverse du cholestérol sur la réponse inflammatoire.....	p115
a. Effets directs du cholestérol.....	p115
b. Effets indirects du cholestérol par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs nucléaires LXR.....	p115
c. Effets de SR-BI, de la CETP et de la PLTP sur la réponse inflammatoire.....	p116
d. Effets des lipoprotéines HDL sur la réponse inflammatoire.....	p118
IV. Utilisation de LPS marqués pour étudier le transport inverse du LPS.....	p119
1. Marquage fluorescent pour une détection des LPS par microscopie optique.....	p119
2. Marquage radioactif pour une détection des LPS par scintigraphie.....	p119

3. Développement d'un LPS marqué par un agent bimodal fluorescent/radioactif à demi-vie courte pour une détection par Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP).....	p120
---	------

V. Conclusion.....	p121
--------------------	------

RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT **p122**

A. Présentation des travaux de Recherche et de Développement.....p123

I. Problématiques et stratégies.....p123

1. Problématique n°1.....	p124
2. Problématique n°2.....	p125
3. Problématique n°3.....	p125

B. Les travaux de Recherche et de Développement.....p126

I. Article n°1 : Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus amebocyte lysate assay.....p126

- Fiche de synthèse.....	p126
- Abstract.....	p129
- Introduction.....	p130
- Materials and Methods.....	p132
- Statistics.....	p135
- Results.....	p136
- Discussion.....	p139
- Disclosures / Conflict of interest.....	p142
- Acknowledgements.....	p142
- References.....	p143
- Figure legends.....	p148
- Table of contents.....	p151

II. Article n°2 : Polysaccharide chain length of lipopolysaccharides from Salmonella minnesota is a determinant of aggregation, plasma clearance and proinflammatory effect.....p159

- Fiche de synthèse.....	p159
- Abstract.....	p160
- Introduction.....	p160
- Materials and methods.....	p161
- Results.....	p163
- Discussion.....	p164
- References.....	p167
- Footnotes.....	p170
- Figure legends.....	p170
- Table of contents.....	p172

III. Article n°3 : Dual labelling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy.....p179

- Fiche de synthèse.....	p179
- Abstract.....	p180
- Introduction.....	p180
- Results and Discussion.....	p181
- Conclusion.....	p184
- Methods.....	p184
- Author information.....	p185
- Acknowledgments.....	p185
- References.....	p185

RESULTATS, DISCUSSION & CONCLUSIONS GENERAUX _____p187

I. Principaux résultats.....p188

1. Article n°1.....	p189
2. Article n°2.....	p189
3. Article n°3.....	p190

II. Discussion générale des résultats.....p191

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications

Pais de Barros JP, Gautier T, **Sali W**, Adrie C, Choubley H, Charron E, Lalande C, Le Guern N, Deckert V, Monchi M, Quenot JP, Lagrost L, (2014) Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *Clin Chem*

Sali W, Pais de Barros JP, Labbé J, Deckert V, Duhéron V, Le Guern N, Blache D, Chaumont D, Lesniewska E, Gasquet B, Lagrost L, Gautier T (2014) Polysaccharidic chain length of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* is a determinant of aggregation, plasma clearance and proinflammatory effect. *J innate immun*

Duheron V, Moreau M, Collin B, **Sali W**, Bernhard C, Goze C, Gautier T, Pais de Barros JP, Deckert V, Brunotte F, Lagrost L, Denat F (2014) Dual labeling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy. *ACS Chem Biol* 9:656-62

Communications affichées

Sali W, Pais de Barros JP, Labbé J, Le Guern N, Lagrost L, Gautier T. LPS aggregability determines the anti-inflammatory effect of PLTP during endotoxemia. "1ère journée du centre UMR866 LNC (Lipides, Nutrition, Cancer)", 16 mars 2012, Dijon, France.

Sali W, Pais de Barros JP, Labbé J, Le Guern N, Lagrost L, Gautier T. LPS aggregability determines the anti-inflammatory effect of PLTP during endotoxemia. "XVIIIe Forum des Jeunes Chercheurs", 6 et 7 septembre 2012, Besançon, France.

Duheron V, Moreau M, Collin B, **Sali W**, Bernhard C, Gautier T, Brunotte F, Lagrost L, Denat F. Multimodal labeling of LPS for SPECT/CT and fluorescence dual imaging. "4ème congrès GPOL", 2-4 juillet 2012, Toulouse, France.

Communication orale

Duheron V, Moreau M, Collin B, **Sali W**, Bernhard C, Goze C, Gautier T, Pais de Barros JP, Deckert V, Brunotte F, Lagrost L, Denat F. Marquage du LPS avec un agent bimodal : Validation de la technique et application. "Journée Pharmimage", 24 janvier 2012, Dijon, France. **Communication orale par W. Sali.**

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux

Tableau 1. Profils des principales apolipoprotéines (apo) humaines.....	p9
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des lipoprotéines.....	p10
Tableau 3. La famille des protéines LT/LBP.....	p13
Tableau 4. Valeurs des paramètres de performance des différents types d'analyseur.....	p51
Tableau 5. Les six critères de défaillance du score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment).....	p86

Figures

Figure 1. Classification des états septiques.....	p3
Figure 2. Représentation tridimensionnelle de la structure générale d'une lipoprotéine.....	p8
Figure 3. Représentation du métabolisme des lipoprotéines dans ces trois composantes de transports.....	p14
Figure 4. Représentation en coupe de l'enveloppe d'une bactérie à Gram-négatif.....	p18
Figure 5. Schéma de la structure des différents chémotypes de LPS pour <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>minnesota</i>	p19
Figure 6. Formules des structures chimiques du lipide IV _A et de différents lipides A.....	p23
Figure 7. Schéma d'ensemble de la voie de biosynthèse du LPS.....	p26

Figure 8. Transfert des LPS vers la face extracellulaire de la membrane externe par la voie " <i>LPS transfert pathway</i> "	p27
Figure 9. Schéma de synthèse des trois voies d'activation du système du complément par les LPS.....	p34
Figure 10. Représentation tridimensionnelle des trois formes des complexes supramoléculaires de LPS : vésicule, micelle ou réticulaire.....	p40
Figure 11. Arrêt sur image de la simulation du comportement du LPS Re en présence de cations calcium Ca^{2+} à 0 , 50 et 100 picosecondes après l'équilibre.....	p41
Figure 12. Schéma de la position de clivage lors de l'hydrolyse acide douce du LPS en présence de SDS.....	p47
Figure 13. Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	p48
Figure 14. Domaine de résolution des techniques de détermination de taille des complexes supramoléculaires de LPS en comparaison à la Microscopie Optique.....	p54
Figure 15. Représentation de la mesure des fluctuations de l'intensité diffusée par DLS.....	p55
Figure 16. Détermination graphique du temps de relaxation t_c à partir de la fonction d'auto-corrélation.....	p55
Figure 17. Représentation en coupe tridimensionnelle d'un microscope électronique à transmission.....	p58
Figure 18. Représentation d'un microscope à force atomique.....	p60
Figure 19. Représentation des couches ionique entourant une particule et du potentiel zêta.....	p62

Figure 20. Représentation de la répulsion électrostatique entre particules en fonction du potentiel zêta.....	p64
Figure 21. Représentation tridimensionnelle de la molécule de pyrène.....	p65
Figure 22. Spectre d'émission de fluorescence du pyrène sous l'effet d'une excitation à 335nm.....	p66
Figure 23. Schéma représentant le principe du test LAL et ses interférents.....	p69
Figure 24. Schéma du mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon deux voies différentes.....	p76
Figure 25. Schéma du mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon deux voies différentes, dépendantes de la LBP.....	p77
Figure 26. Modélisation structurale de la dimérisation de deux complexes hétérodimériques TLR4-MD2 liés chacun à une molécule de LPS.....	p79
Figure 27. Schéma des voies de signalisation de TLR4.....	p82
Figure 28. Représentation des effets biologiques de l'endotoxémie.....	p83
Figure 29. Représentation des conformations de lipides A différant par le nombre (4, 5 ou 6) et la composition de chaînes acyles (symétriques versus asymétriques), ou le degré de phosphorylation (mono- versus di-phosphoryle).....	p88
Figure 30. Représentation de la relation entre l'architecture supramoléculaire et l'activité biologique des LPS.....	p89
Figure 31. Représentation des transporteurs protéiques spécifiques impliqués dans l'efflux de cholestérol.....	p93

Figure 32. Schéma du métabolisme des Lipoprotéines de Haute Densité (<i>High Density Lipoproteins</i> , HDL) et transport inverse du cholestérol.....	p96
Figure 33. Schéma du métabolisme hépatique du cholestérol.....	p97
Figure 34. Représentation du mécanisme d'action de la BPI.....	p100
Figure 35. Représentation de la séquence causale mise en jeu dans l'endotoxémie et responsable de l'effet pro-inflammatoire net des LPS.....	p199

LISTE DES ABREVIATIONS

ACL : *Antigen Carrier Lipid*

AP-1 : *Activating Protein-1*

Apo : Apolipoprotéine

ABCA1 : *ATP-binding cassette-type A1*

ABCG1 : *ATP-binding cassette-type G1*

ACP : *Acyl Carrier Protein*

BPI : *Bactericidal Permeability Increasing protein*

Btk : *Bruton's Tyrosine Kinase*

C14-3OH : Acide 3-hydroxymyristique

Ca : Calcium

CAC : Concentration d'Agrégation Critique

CD14 : Cluster de différenciation 14, *Cluster of Differentiation 14*

CE : Cholestérols Estérifiés

CETP : *Cholesteryl Ester Transfer Protein*

CLA-1 : *CD36 and LIMPII Analogous-1*

CM : ChyloMicrons

CMC : Concentration Micellaire Critique

CYP : CYtochrome P

Kdo : Acide 3-desoxy-D-manno-oct-2-ulosonique

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

DLS : *Dynamic Light Scattering*

DNA : *Deoxyribonucleic acid*

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate

ESI : Électro-nébulisation, *ElectroSpray Ionization*

FAB : Bombardement d'atome rapide, *Fast Atom Bombardment*

FAIMS : *high-Field Asymmetric waveform Ion Mobility Spectrometry*

FAK : *Focal Adhesion Kinase*

FIO₂ : Fraction Inspirée en Oxygène ou ratio

FT-ICR : Transformée de Fourier et résonance cyclotronique, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

GCMS : *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

HDL : *High-Density Lipoprotein*

IC : Ionisation Chimique

IDL : *Intermediate-Density Lipoprotein*

IE : Ionisation Electronique

IκB : Inhibitor of NF-κB

IKK : IκB kinase

IL : InterLeukine

IRAK4 : *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4*

IRAK1-TOLLIP : *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1-Toll Interacting Protein*

JNK : *Jun N-terminal Kinase*

Kdo : Acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique

ECA : Antigène commun des entérobactéries, Enterobacterial Common Antigen

Und-P : Undécaprényl-Phosphate

UDP-GlcNAc : Uridine DiPhosphate N-acétylglucosamine

LAL : *Limulus Amebocyte Lysate*

LBP : Protéine de fixation du LPS, *LPS Binding Protein*

LCAT : Lécithine-cholestérol acyltransférase, *Lecithin-Cholesterol AcylTransferase*

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, *Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometry*

LDL : *Low-Density Lipoprotein*

LDLR : Récepteurs des lipoprotéines LDL, *LDL Receptor*

LH : Lipase Hépatique

LE : Lipase Endothéliale

LPS : LipopolySaccharides

LPL : LipoProtéine Lipase

LRP : *LDL Receptor-related Protein*

LT/LBP : *Lipid Transfer/Lipopolysaccharide Binding Protein*

LTQ : Quadripole à trappe linéaire, *Linear Trap Quadrupole*

LXR : *Liver X receptor*

MAC : Complexe d'attaque membranaire, *Membrane Attack Complex*

MFA : Microscopie à Force Atomique

MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

MAP3K : Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase

MASP : *Mannose Binding Lectin-Associated Perine Protease*

MBL : Lectine liant le mannose, *Mannose Binding Lectin*

mCD14 : Cluster de différenciation 14 associé à la membrane, *Membrane-associated Cluster of Differentiation 14*

MD-2 : facteur de Différenciation Myéloïde 2, *Myeloid differentiation factor 2*

MET : Microscopie Électronique à Transmission

Mg : Magnésium

mLBP : Protéine membranaire de fixation du LPS, *Membrane-associated LPS Binding Protein*

MyD88 : *Myeloid Differentiation factor 88*

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*

P38 MAPK : *P38 Mitogen-Activated Protein Kinase*

PAM : Pression Artérielle Moyenne

PaO₂ : Pression atmosphérique en Oxygène

PCS : *Photon Correlation Spectroscopy*,

PDMS : Désorption par plasma, *Plasma Desorption Mass Spectrometry*

pH : potentiel Hydrogène

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biPhosphate

PLTP : *PhosphoLipid Transfer Protein*

PMN : Leucocyte polynucléaire, *PolyMorphoNuclear leukocyte*

PVDF : *PolyVinylidene Fluoride*

Q : Quadripole

QESL : *Quasi-Elastic Scattering Light*

R-LPS : *Rough-LPS*

RNA : *Ribonucleic acid*

SAA : Serum Amyloïde A

sCD14 : Cluster de différenciation soluble, *Soluble Cluster of Differentiation 14*

SDS/PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SDMV : Syndrome de Défaillance MultiViscérale

sLBP : Protéine soluble de fixation du LPS, Soluble Lipopolysaccharide Binding Protein

S-LPS : Smooth-LPS

SOFA : *Sepsis-related Organ Failure Assessment*

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

SR-BI : *Scavenger Receptor Class BI*

Src : *SaRComa*

SIRS : Syndrôme de réponse inflammatoire systémique, Systemic Inflammatory Response Syndrome

TAK1-TAB : *TGF β Activated Kinase 1-TAK1 Binding protein*

TANK : *TRAF family member-Associated NF-Kappa-B activator*

TBK1 : *TRAF family member-associated NF- Kappa-B activator-Binding Kinase 1*

TEMP : Tomographie par Emission Monophotonique

TG : TriGlycérides

TIR : *Toll/Interleukin-1 Receptor*

TIRAP/MAL : *TIR domain Adapter Protein/MyD88 Adapter-Like*

TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

TOF : *Time Of Flight*

TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor*

TRAM : *TRIF-Related Adaptor Molecule*

TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing InterFeron- β*

VLDL : *Very Low-Density Lipoprotein*

AVANT-PROPOS

A. Le LipoPolySaccharide (LPS), composante étiologique de maladies non infectieuses et infectieuses

Il existe un large spectre de maladies infectieuses ou non dans lesquelles les LPS jouent un rôle clé. En effet, certains LPS sont connus pour manifester l'un des plus forts pouvoirs pro-inflammatoires et pour provoquer sur les organismes hôtes l'une des collections d'effets biologiques les plus étendues parmi l'ensemble des molécules du monde vivant.

Dans le cas des maladies inflammatoires non infectieuses impliquant les LPS, ceux-ci sont introduits dans l'organisme en traversant les barrières physiologiques de l'organisme sous forme libre ; alors que dans le cas des maladies inflammatoires infectieuses impliquant les LPS, ces derniers pénètrent l'organisme en étant ancrés aux bactéries, puis sont libérés par celles-ci une fois dans le milieu intérieur.

Les maladies inflammatoires non infectieuses impliquant le LPS sont le résultat de :

- l'inhalation de LPS dans certains environnements professionnels, notamment dans le secteur agricole [Marchand, 1996], le compostage des déchets [Douwes, 2000] et l'industrie du coton [Neal, 1942 ; Christiani, 1993 ; Schwartz, 2011] ;
- la translocation de LPS au travers de la paroi intestinale d'individus ayant un régime alimentaire riche en graisses [Cani, 2008 ; Burcelin, 2009] ou dont la perméabilité de la paroi intestinale a été augmentée [Berg, 1999, Camus, 1997] ;
- l'introduction de LPS dans le compartiment vasculaire des patients lors de traumatismes portant atteintes à l'intégrité des barrières protectrices de l'organisme ou d'actes médicaux invasifs (injections, transfusions, hémodialyses, circulation extra-corporelles, actes chirurgicaux...etc.) [Bommer, 1996].

Les maladies inflammatoires infectieuses impliquant le LPS sont essentiellement le fait d'une pénétration de bactéries au travers des muqueuses de l'organisme et dans une moindre proportion au travers de lésions cutanées [Bernard, 1997].

B. Le LPS, une molécule méconnue au centre du modèle expérimental d'étude du syndrome de réponse inflammatoire systémique et de l'inflammation

Dans de nombreuses maladies inflammatoires infectieuses et non infectieuses impliquant les LPS, on observe un syndrome dont la fréquence et la gravité constituent un véritable enjeu de santé publique à l'échelle mondiale : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (ou *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS, Figure 1).

Depuis 1992, un consensus international définit ce syndrome comme un continuum physiopathologique de la réponse inflammatoire systémique à une infection. Ce continuum se compose de trois phases de gravité croissante :

- le sepsis ;
- le sepsis grave, sévère ou aigu ;
- le choc septique.

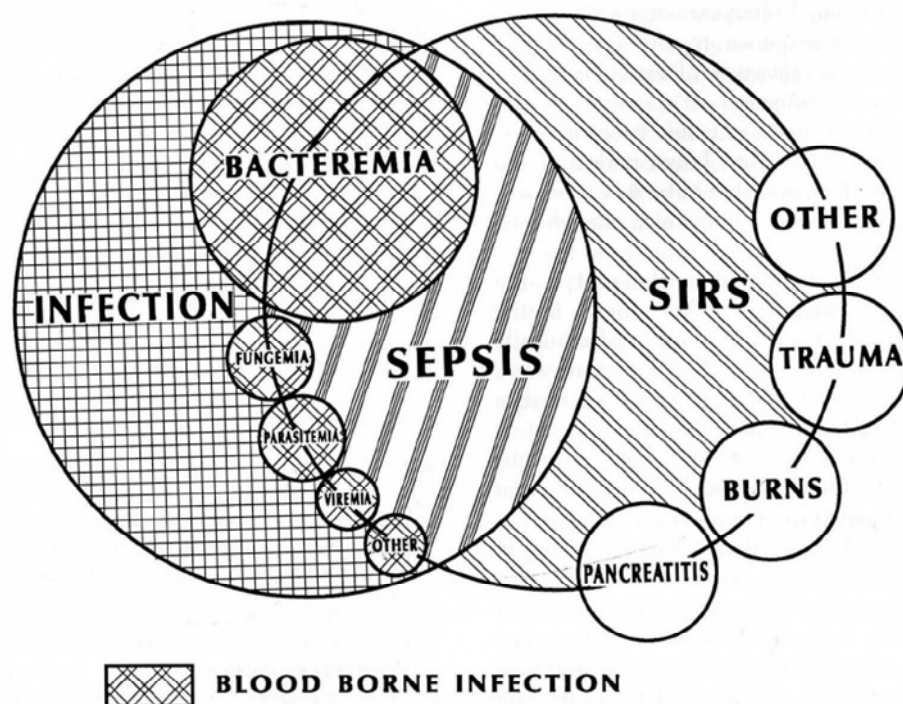


Figure 1. Classification des états septiques. D'après Bone, 1992.

Avant-Propos

Selon Annane D. et coll. [Annane, 2003], l'incidence du sepsis grave et du choc septique sont globalement en augmentation depuis plusieurs années. Sur une période de 22 ans allant de 1979 à 2000, Martin G.S. et coll. dénombrent 10 319 418 cas de sepsis sur une population estimée à 750 millions d'hospitalisations aux Etats-Unis [Martin, 2003]. En France, l'étude "*Episepsis*" datant de 2004, estime l'incidence du sepsis sévère à 95 cas pour 100 000 habitants [Episepsis, 2004]. Adhikiri estime à plus de 19 millions les cas de sepsis dans le monde [Adhikiri, 2010].

Le sepsis est une cause significative de mortalité, notamment aux âges extrêmes de la vie [Watson, 2003 ; Wang 2007 ; Angus 2001] et chez les patients en état post-opératoire [Bateman 2010]. Selon le centre "Centers for Disease Control and Prevention", le sepsis est la 10^{ème} cause de décès aux Etats-Unis [Hoyert, 2001].

L'étendue des cas et l'importance de la mortalité de par le monde font du SIRS un enjeu global de santé publique.

De façon remarquable, le SIRS peut être induit par une grande variété de causes non infectieuses. Nous l'observons notamment dans l'ensemble des maladies liées au LPS. En effet, l'internalisation accidentelle ou l'administration volontaire de LPS dans le compartiment vasculaire induit un état pathologique non infectieux nommé endotoxémie (le LPS étant aussi connu en tant qu'endotoxine), lequel est accompagné du SIRS. L'apparition de LPS dans le compartiment vasculaire étant donc une cause suffisante du SIRS, son administration est utilisée pour induire l'endotoxémie comme un modèle expérimental d'étude de l'inflammation et notamment du SIRS.

Pourtant l'utilisation du LPS est délicate à maîtriser pour plusieurs raisons :

- son ubiquité : le LPS est en effet une molécule abondamment présente dans notre environnement quotidien ;
- sa diversité : le LPS est une molécule synthétisée par les bactéries avec une grande variabilité structurelle en fonction des conditions environnementales et de la souche bactérienne. D'ailleurs, nous constatons même cette variabilité au sein d'une même bactérie, qui peut présenter à sa surface différents types chimiques ou chémotypes de LPS ;

Avant-Propos

- son comportement d'agrégation : ce comportement est propre aux molécules amphiphiles comme l'est le LPS avec une région constitutive hydrophile et une autre hydrophobe.

Ces trois facteurs (ubiquité, diversité et comportement d'agrégation) constituent de sérieuses entraves à la standardisation du modèle d'étude du SIRS et de l'inflammation induits par les LPS, ainsi qu'à la conception et l'utilisation efficaces d'outils de dosage et de suivi métabolique des LPS. En outre, l'interprétation des résultats de ce modèle reste limitée en l'absence d'une meilleure compréhension du comportement d'agrégation des LPS et de l'impact de celui-ci sur la réponse inflammatoire.

Le but de ce mémoire et des travaux expérimentaux connexes, est donc d'apporter une meilleure maîtrise du modèle d'étude du SIRS et de l'inflammation induits par les LPS grâce à une compréhension plus approfondie des relations entre la structure chimique du LPS, son comportement d'agrégation et ses effets physiopathologiques.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

A. L'endotoxémie : LPS, signalisation et modulateurs de l'inflammation

L'accumulation de LPS dans le sang ou endotoxémie, est à l'origine de la réponse inflammatoire caractéristique du SIRS et du sepsis. Le LPS est une molécule amphiphile composée d'une région hydrophile polysaccharidique liée à une région hydrophobe, le lipide A, qui est le principe pro-inflammatoire du LPS. De par son amphiphilie, le LPS a tendance à s'agréger en milieu aqueux pour former des complexes supramoléculaires.

La voie de reconnaissance du lipide A et de signalisation cellulaire par laquelle le LPS va déclencher la réponse inflammatoire est relativement bien décrite dans la littérature scientifique : cette voie fait intervenir le récepteur multimérique TLR4-MD2, un acteur clef présent à la surface des cellules de l'immunité innée. Pourtant, de nombreux autres éléments jouent un rôle déterminant dans le pouvoir pro-inflammatoire d'un LPS donné, parmi lesquels des facteurs capables de moduler l'interaction entre le LPS et le récepteur TLR4-MD2, et d'autres capables d'affecter la capacité de l'organisme hôte à détoxifier et éliminer le LPS. Les propriétés physico-chimiques des complexes supramoléculaires de LPS, ainsi que la prise en charge du LPS par les lipoprotéines et les protéines de la famille *Lipid Transfer/Lipopolysaccharide Binding Protein* (LT/LBP) font partie de ces éléments clefs à considérer. En effet, l'association des LPS en complexes supramoléculaires affecte leurs propriétés biologiques. En outre, la capacité des LPS à s'associer aux protéines de la famille LT/LBP et aux lipoprotéines, favorise l'activation des leucocytes par la voie de signalisation TLR4-MD2 ou neutralise le LPS et transporte celui-ci jusqu'au foie en vue de son excrétion biliaire.

B. L'élimination du LPS : l'autre face du transport inverse du cholestérol

Ce transport du LPS de la périphérie vers le foie est nommé transport inverse du LPS (ou *Reverse Lipopolysaccharide Transport*, RLT) car il suit une voie métabolique similaire à celle du transport inverse du cholestérol (ou *Reverse Cholesterol Transport*, RCT). Le transport inverse du cholestérol est la voie d'élimination du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie, où il est excrété dans la bile. Ce

Introduction générale

transport vasculaire du cholestérol, molécule hydrophobe, se fait essentiellement par les lipoprotéines de haute densité (ou *High-Density Lipoprotein*, HDL).

I. Les lipoprotéines : ces complexes supramoléculaires de compositions variées

Comme tout lipide, le cholestérol est une molécule hydrophobe dont le transport vasculaire (milieu aqueux) se fait par les lipoprotéines. Ces dernières sont des complexes supramoléculaires constituées de plusieurs niveaux structurels (Figure 2) :

- le cœur de la lipoprotéine est constitué de cholestérols estérifiés et de triglycérides, des molécules fortement hydrophobes ;
- une couche externe ou monocouche, faite de molécules amphiphiles qui enveloppent le cœur. Cette monocouche est constituée de phospholipides, cholestérols non estérifiés et d'apolipoprotéines (apo) dont les régions hydrophobes pointent vers le cœur de la lipoprotéine, alors que les régions hydrophiles sont en contact avec le milieu vasculaire. Cette organisation polarisée de la monocouche permet de solubiliser et stabiliser ce complexe supramoléculaire de lipides qu'est la lipoprotéine en milieu aqueux.

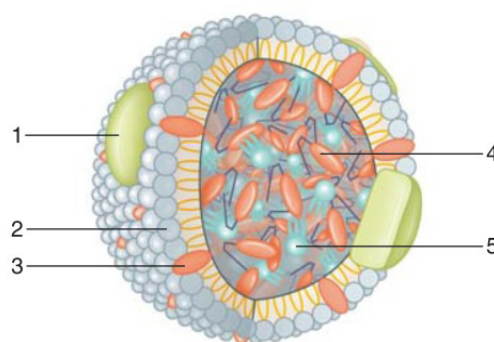


Figure 2. Représentation tridimensionnelle de la structure générale d'une lipoprotéine. Les lipides neutres (cholestérols estérifiés et triglycérides) constituent le cœur hydrophobe. Les lipides amphiphiles (phospholipides et cholestérols non estérifiés) et les apolipoprotéines forment la couche externe. 1. Apolipoprotéine ; 2. Phospholipides ; 3. Cholestérol non-esterifié ; 4. Cholestérol estérifié ; 5. Triglycérides. D'après Gautier, 2011.

Introduction générale

Il est intéressant de préciser qu'outre leur rôle dans la solubilisation et la stabilité des lipoprotéines, les apolipoprotéines adressent les lipoprotéines à leurs cibles respectives, assurant ainsi un métabolisme spécifique à chaque catégorie de lipoprotéines (Tableau 1).

Nom	Tissu	Distribution	Fonction
ApoA-I	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Structurelle Activateur physiologique de la LCAT Efflux de cholestérol
ApoA-II	Foie, (intestin)	HDL	Structurelle Modulateur de la HL Efflux de cholestérol
ApoA-IV	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Transport <i>reverse</i> du cholestérol Activateur de la LCAT Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoA-V	Foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoB100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle Synthèse et sécrétion des VLDL Ligand du récepteur LDLR
ApoB48	Intestin	Chylomicrons	Structurelle Synthèse et sécrétion des chylomicrons Ligand du récepteur B48R
ApoC-I	Foie (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP Activateur de la LCAT Inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
ApoC-II	Foie (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
ApoC-III	Foie (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL Inhibe la captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoD (apoA-III)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport <i>reverse</i> du cholestérol (?)
ApoE	Foie, macrophage, cerveau	Chylomicron, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
ApoF	Foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
ApoG		HDL	?
ApoH (β2 glycoprotéine I)		HDL	?
ApoJ (clusterine)		HDL	Anti-inflammatoire
ApoL		HDL	Immunité innée
ApoM		HDL	Génération de préβHDL (?)
ApoSAA		HDL, chylomicron	Phase aiguë de l'inflammation

Tableau 1. Profils des principales apolipoprotéines (apo) humaines. *VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; IDL : Intermediate Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein ; HDL : High Density Lipoprotein ; CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein ; LRP : LDL Receptor-Related Protein ; LPL : Lipoprotein Lipase ; LCAT : Lecithin/Cholesterol AcylTransferase ; HL : Hepatic Lipase. D'après Gautier, 2011.*

Introduction générale

Cette structure de base des lipoprotéines est constante, toutefois la variation de composition de ces deux couches induit une grande variété de types de lipoprotéines, qui diffèrent par leur taille et leur densité. On identifie au moins 5 catégories de lipoprotéines en fonction de ces deux critères (Tableau 2) :

- les chylomicrons (CM) ;
- les lipoprotéines de très basse densité (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) ;
- les lipoprotéines de densité intermédiaire (*Intermediate Density Lipoprotein*, IDL) ;
- les lipoprotéines de basse densité (*Low Density Lipoprotein*, LDL) ;
- les lipoprotéines de haute densité (*High Density Lipoprotein*, HDL). Cette catégorie regroupe notamment trois sous-catégories : les HDL2, les HDL3 et les préβHDL. Ces derniers sont les précurseurs des HDL.

Lipoprotéine	Mobilité électrophorétique	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion CE/TG	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	Pas de migration	0,93	75-1200	1/19	B48, E
VLDL	Préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E
IDL	Préβ lent	1,006-1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	A-I, A-II
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	A-I, A-II
préβHDL	Préβ	1,210-1,250	< 7 (disques)	nd	A-I

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des lipoprotéines. *VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; IDL : Intermediate Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein ; HDL2 : High Density Lipoprotein 2 ; HDL3 : High Density Lipoprotein 3 ; CE : Cholestérols Estérifiés ; TG : Triglycérides ; nd : non-délectable. Adapté de Gautier, 2011.*

II. Le métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Les lipoprotéines cheminent dans le plasma au sein de trois voies de transport, qui constituent le métabolisme des lipoprotéines :

Introduction générale

- voie 1 : Une voie d'apport des lipides exogènes ou voie entéro-hépatique ;
- voie 2 : Une voie d'apport des lipides endogènes ;
- voie 3 : Le transport inverse du cholestérol dont il a été question plus tôt dans cet exposé.

1. La voie d'apport des lipides exogènes ou voie entéro-hépatique (Voie 1)

Cette voie commence par l'absorption des lipides alimentaires au travers de la paroi intestinale jusque dans les entérocytes. Dans les entérocytes, les lipides alimentaires sont incorporés au CM. Ceux-ci sont ensuite libérés dans la lymphe qu'ils quittent ensuite pour rejoindre le compartiment vasculaire. Les CM sont convertis en particules résiduelles (*remnants*) au fil de l'hydrolyse de leurs triglycérides en acides gras non estérifiés par la LipoProtéine Lipase (LPL). Outre les acides gras non estérifiés captés par les tissus périphériques et les particules résiduelles captées par le foie, cette conversion libère également des composés de surface des CM. Sous l'action de la Protéine de Transfert des Phospholipides (ou *PhosphoLipid Transfer Protein*, PLTP), ces composés forment les préβHDL.

2. La voie d'apport des lipides endogènes (Voie 2)

Cette voie débute par la sécrétion plasmatique de VLDL par le foie. Les VLDL sont alors convertis en IDL par l'hydrolyse des triglycérides sous l'action de la LPL. Le contenu en triglycéride finit d'être dégradé par la Lipase Hépatique (LH), ce qui aboutit à la formation de LDL, principaux transporteurs du cholestérol vers les tissus périphériques.

3. Le transport inverse du cholestérol (Voie 3)

Cette voie assure le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie où le cholestérol est excrété sous forme d'acides biliaires. Elle est constituée des trois étapes de la maturation des lipoprotéines HDL de HDL natives (ou préβHDL) à HDL matures :

Introduction générale

1) Prise en charge de l'excès de cholestérol cellulaire périphérique par les lipoprotéines HDL natives. L'efflux de cholestérol cellulaire des tissus périphériques vers les lipoprotéines HDL natives se fait via le transporteur *ATP-binding cassette-type A1* (ABCA1) ;

2) Maturation des lipoprotéines HDL par l'action de différentes protéines :

- estérification du cholestérol par la Lecithin/Cholesterol AcylTransferase (LCAT) ;
- enrichissement des HDL matures via le transporteur *ATP-binding cassette-type G1* (ABCG1) ;
- remodelage des HDL matures par la PLTP et la protéine de transfert des esters de cholestérol (ou *Cholesteryl Ester Transfer Protein*, CETP) : l'action de la PLTP augmente la taille des HDL. La CETP peut court-circuiter la voie de transport inverse du cholestérol en faveur de la voie d'apport des lipides endogènes ;

3) Captage hépatique sélectif du cholestérol des lipoprotéines HDL par le récepteur "*Scavenger Receptor Class BI*" (SR-BI) et son excrétion biliaire.

III. La famille des protéines LT/LBP : entre métabolisme des lipoprotéines et immunité innée

La CETP et la PLTP jouent donc un rôle important dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Tableau 3). Sur la base de leur similarité de structure génétique et protéique, on considère que la CETP et la PLTP appartiennent à la famille des protéines LT-LBP, qui contient également la LBP (*LPS Binding Protein*) et la BPI (*Bactericidal Permeability Increasing protein*). Or, ces deux protéines ont une fonction dans le système immunitaire innée de par leur capacité à interagir avec le LPS. La BPI, a en outre une fonction bactéricide (Tableau 3).

Introduction générale

	PLTP	CETP	LBP	BPI
Localisation chromosomique	20 ^a	16 ^b	20 ^c	20 ^d
Nombre d'acides aminés	476 ^d	476 ^e	456 ^f	456 ^f
Masse moléculaire	55 kDalton (kDa) ^d	53 kDa ^g	60 kDa ^h	55 kDa ⁱ
Homologie avec la PLTP (%)	-	20 ^d	24 ^d	26 ^d
Biodistribution	Lipoprotéines HDL de grande taille ^j	Lipoprotéines HDL de petite taille ^j	Lipoprotéines ^k , Membrane des monocytes et des macrophages ^{l,m}	Membrane des granulations primaires des polynucléaires neutrophiles ^{no} ; Membrane des granulocytes ^p ; Membranes des monocytes ^o .
Fonctions	Transfert de phospholipides et vitamine E ; Neutralisation des LPS ^q .	Transfert d'esters de cholestérol, triglycérides et phospholipides ^r .	Transfert de LPS et de phospholipides ^{s,t} ; Neutralisation de LPS ^u .	Liaison aux LPS ; Activité bactéricides ^v .

Tableau 3. La famille des protéines LT/LBP.

a. Whitmore, 1995

b. Lusa, 1987

c. Gray, 1993

d. Day, 1994

e. Drayna, 1987

f. Beamer, 1998

g. Zhang, 2012

h. Tobias, 1986

i. Tobias, 1997

j. Speijer, 1991

k. Wurfel, 1995

l. Müller, 2003

m. Roes, 2006

n. Weiss, 1987

o. Dentener, 1996

p. Weersink, 1993

q. Lagrost, 1998

r. Charles, 2012

s. Schumann, 1990

t. Yu, 1997

u. Gutschmann, 2001

v. Weiss, 1984

Introduction générale

Comme le laisse présager leur appartenance à la famille des protéines LT/LBP, outre leurs fonctions dans le métabolisme des lipides, la CETP et la PLTP vont moduler la cinétique d'élimination et la neutralisation des LPS tout au long de son transport inverse (Figure 3). Cette capacité du LPS à interagir avec des éléments appartenant soit au métabolisme des lipoprotéines, soit au système immunitaire inné, ou encore aux deux à la fois, en font une molécule remarquable dont le métabolisme est complexe. Et ce d'autant plus que les LPS peuvent interagir avec ces deux systèmes sous deux formes distinctes (monomérique ou agrégée) dont les propriétés physico-chimiques et les activités biologiques sont différentes.

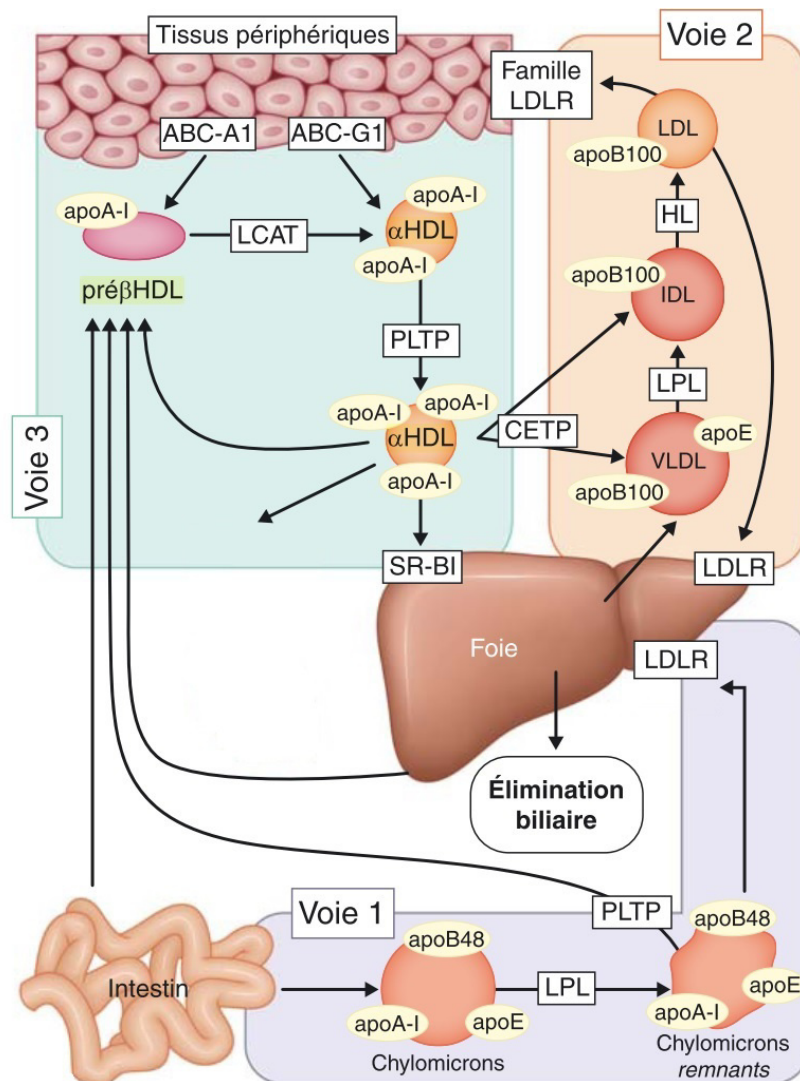


Figure 3. Représentation du métabolisme des lipoprotéines dans ces trois composantes de transports. *D'après Gautier, 2011.*

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

A. Les LPS

A. Les LipoPolySaccharides (LPS)

I. Le LPS dans l'Histoire de la Science

En 1865, la notion de substance pyrogène apparaît pour la première fois dans un écrit de Christian Albert Theodor Billroth [Billroth, 1865], un chirurgien allemand.

En 1884, le microbiologiste danois Christian Gram met au point la technique de coloration portant son nom. Cette technique permet encore à l'heure actuelle de classer les bactéries selon deux groupes : les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif.

En 1891, William Bradley Coley, un chirurgien new yorkais, commence à traiter ses patients atteints de cancer par des injections d'un mélange de streptocoques tués et de *Serratia marcescens*, une bactérie à Gram-négatif. Cette préparation est nommée la "toxine de Coley".

En 1892, Richard Pfeiffer, médecin et bactériologiste, utilise pour la première fois le terme d'endotoxine par opposition aux exotoxines déjà bien connues [Pfeiffer, 1892]. La même année, Arthur Felix et Edmund Weil, deux microbiologistes anglais, montrent que les endotoxines sont des antigènes bactériens de surface qu'ils nomment "antigènes O".

En 1893, Eugenio Centanni, pathologiste italien, extrait une substance pyrogène de bactérie à Gram-négatif et l'identifie à l'endotoxine [Centanni, 1893].

En 1907, l'étude de Beebe et Tracy démontre que l'activité anti-tumorale de la préparation de Coley était le fait de sa composante Gram-négatif [Beebe, 1907].

En 1933, la microbiologiste Lydia Mesrobian et le médecin biochimiste André Boivin mettent au point une technique d'extraction à l'acide trichloroacétique suffisamment efficace et reproductible pour leur permettre de déterminer la structure chimique de l'endotoxine, qu'ils qualifient les premiers de glucido-lipidiques [Boivin, 1933].

En 1943, en essayant d'isoler le principe anti-tumoral de *Serratia marcescens*, Shear M. J. isole un extrait d'endotoxine qu'il caractérise pour la première fois comme étant un "lipopolysaccharide" [Shear, 1943].

II. Localisation des LPS

Les LPS sont des composants essentiels et spécifiques à l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif (Figure 4). Alors que chez la bactérie à Gram-positif, l'enveloppe bactérienne se compose de l'intérieur vers l'extérieur de la bactérie, de la membrane plasmique et d'une couche de peptidoglycane (ou muréine). L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif comporte de surcroît une troisième couche, la membrane externe. L'espace compris entre la membrane externe et la membrane plasmique contient la couche de peptidoglycane et se nomme "espace périplasmique".

Cette membrane externe est, à l'instar de la membrane cytoplasmique, une bicouche lipidique intégrant divers types de protéines ainsi que des glycolipides qui sont impliqués dans l'interaction avec le milieu extérieur, notamment pour établir une communication avec d'autres cellules. Parmi les glycolipides enchâssés dans le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif on trouve principalement les LPS. En effet, ce feuillet externe contient environ 45% de LPS qui recouvrent près de 75% de sa surface. Ainsi, chez *Escherichia coli*, on dénombre environ 3 millions de molécules de LPS par bactérie [Raetz, 2002].

Ces molécules de LPS sont liées entre elles par des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Ces cations forment des ponts entre les phosphates des molécules de LPS, participant ainsi à la stabilité et l'imperméabilité de la membrane externe [Nikaido 1994 ; Rosenfeld 2006].

Cette imperméabilité de la membrane externe est également le résultat d'une asymétrie dans la distribution des lipides entre les deux feuillets de cette bicouche. Ainsi, une présence majoritaire de glycérophospholipides confère sa fluidité au feuillet interne. Au contraire, le feuillet externe est très peu fluide du fait d'une structure très organisée, quasi-cristalline [Labischinski, 1989].

Etude bibliographique

A. Les LPS

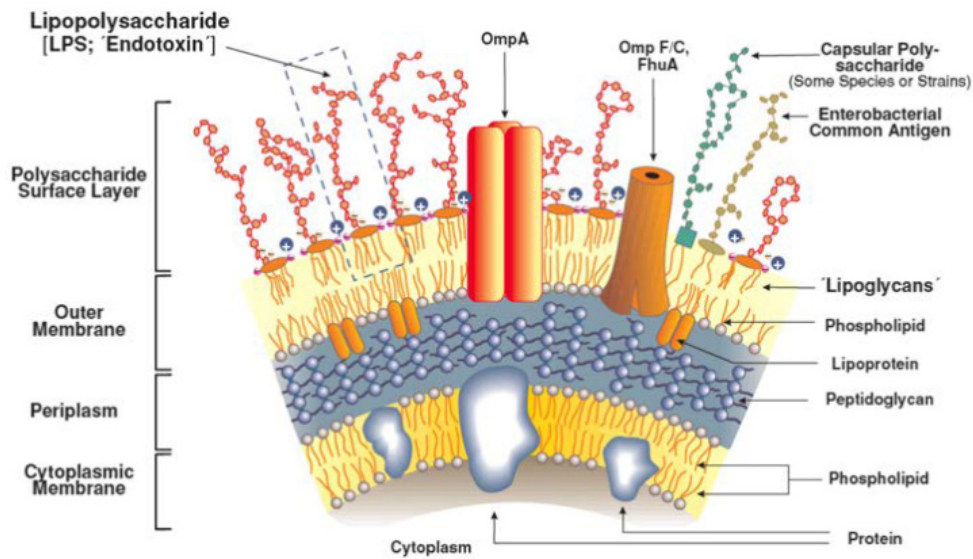


Figure 4. Représentation en coupe de l'enveloppe d'une bactérie à Gram-négatif.

D'après Alexander, 2001.

III. Structure des LPS

Les LPS sont les principaux composants non protéiques de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Schématiquement, ils se divisent en trois domaines structuraux (Figure 5), qui sont du plus distal au plus proximal :

- la chaîne O ou antigène O (pour *Ohn Kapsel*) est une chaîne polysaccharidique. Cet élément des LPS est donc hydrophile ;
- le noyau, qui est un oligosaccharide, fait la liaison entre les deux autres régions des LPS. Il est lui-même divisé en deux parties : le noyau interne, élément distal et plutôt hydrophile et le noyau externe, élément proximal et plutôt hydrophobe ;
- le lipide A, qui possède un caractère hydrophobe, permet aux LPS de s'enchâsser dans le feuillet externe de la membrane externe. Le lipide A est responsable du déclenchement de la réponse inflammatoire impliquant le récepteur TLR4.

Etude bibliographique

A. Les LPS

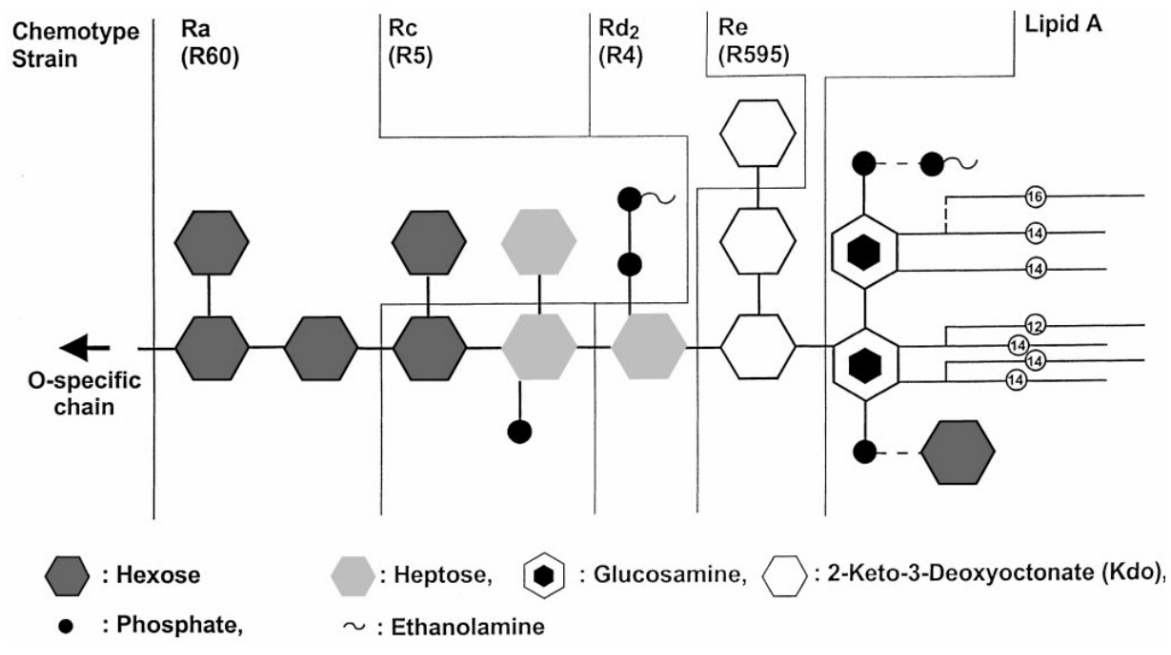


Figure 5. Schéma de la structure des différents chémotypes de LPS pour *Salmonella enterica* serovar *Minnesota*. D'après Brandenburg, 1999.

1. Structure de la chaîne O ou antigène O

La chaîne O est l'élément le plus distal de la bactérie, elle constitue donc l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. A ce titre, la chaîne O est à la fois la première cible des attaques extérieures et la première ligne de défense de la bactérie.

Dans un premier temps, la classification des colonies bactériennes a été fondée sur leur aspect visuel. Celles qui présentaient un aspect rugueux ont alors été qualifiées de "*rough*" alors que celles qui apparaissaient lisses ont été définies comme "*smooth*". La chaîne O a ensuite été désignée comme la cause de ces différentes textures des colonies bactériennes. C'est pourquoi cette nomenclature a été conservée pour décrire les différentes tailles de chaîne O. Ainsi, les LPS ne possédant pas de chaîne O et se réduisant à leur lipide A et à leur noyau, sont qualifiés de "*rough*" (R-LPS). Les LPS pourvus d'une chaîne O se résumant à une seule sous-unité sont désignés par le terme "*semi-rough*" (SR-LPS). Enfin, les LPS présentant une chaîne O complète sont appelés "*smooth-LPS*" (S-LPS).

Etude bibliographique

A. Les LPS

2. Structure du noyau

La mutagenèse par rayonnement ultra-violet ou par agents mutagènes a permis d'obtenir des souches bactériennes mutantes viables produisant des LPS de type "*rough*" dont le noyau était plus ou moins raccourci. L'importance de cette amputation du noyau a été à l'origine d'une nouvelle terminologie pour classer les souches bactériennes mutantes "*rough*" en fonction de la longueur de leur noyau : Ra, Rb, Rc, Rd, Re, avec le terme Ra désignant le mutant présentant le noyau le plus long et le terme Re celui avec le noyau le plus court [Raetz, 1990]. Dans ce dernier cas, le LPS se limite à son lipide A lié à un noyau constitué simplement d'acide 3-desoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo).

3. Structure du lipide A

Le lipide A est la région du LPS proximale à la bactérie. Le lipide A se lie au noyau du LPS par sa partie hydrophile et permet, grâce à sa partie hydrophobe, l'ancrage du LPS dans le feuillet externe de la membrane interne de la bactérie à Gram-négatif. En effet, le lipide A est constitué d'un squelette de di-glucosamine lié en $\beta 1 \Rightarrow 6$, plus ou moins phosphorylé et attaché par des liaisons amides ou esters à des chaînes acyles primaires souvent hydroxylées comme l'acide 3-hydroxymyristique (C14-3OH). Ces dernières peuvent elles-mêmes être estérifiées par des chaînes acyles dites secondaires.

La diversité des motifs "lipide A " des différentes bactéries est importante. Cette diversité est le fait :

- de la variation du nombre de chaînes acyles (généralement entre 4 et 7, exceptionnellement 8) ;
- de leur longueur (C12, C14 et C16 sont les plus communes) ;
- de l'oxydation de l'hydroxyl en position 3 de certaines chaînes acyles par un groupement cétone ;
- du degré d'insaturation des chaînes acyles, ainsi que du degré de phosphorylation du lipide A ;

Etude bibliographique

A. Les LPS

- de la substitution des groupements phosphates du squelette disaccharidique par des résidus positivement chargés comme l'éthanolamine, la glucosamine, le 4-amino-4-desoxy-L-arabinopyranose.

IV. Biosynthèse des LPS

1. Biosynthèse du lipide A

a. Formation du lipide IV_A

Les trois premières étapes de cette biosynthèse impliquent des enzymes cytosoliques, dites "précoces" et l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) comme précurseur. Ce composé est également précurseur de la synthèse du peptidoglycane et de l'antigène bactérien commun ECA, ainsi que de certains antigènes O constitués de N-acétyl-glucosamine.

Dans une première étape, un premier acide gras transporté par une protéine porteuse (*Acyl Carrier Protein*, ACP), est transféré par l'acyltransférase LpxA en position 3 de l'UDP-GlcNAc [Anderson, 1987 ; Anderson, 1993]. La métalloenzyme LpxC déacétyle ensuite le produit formé pour permettre à l'acyltransférase LpxD d'ajouter une deuxième molécule d'acide gras portée par l'ACP [Kelly, 1993], ce qui aboutit à la formation de l'UDP-2,3-diacylglucosamine. Ce composé est le précurseur de la partie terminale non réductrice du lipide A.

Dans une seconde étape, le clivage d'une liaison pyrophosphate de l'UDP-2,3-diacylglucosamine par la pyrophosphatase LpxH forme le 2,3-diacylglucosamine-1-phosphate. Ce composé est appelé "lipide X" [Raetz, 2002].

Dans une troisième étape, la formation du disaccharide de glucosamine acylé qui forme la partie hydrophile du lipide A est finalement achevée par la condensation d'une molécule d'UDP-2,3-diacylglucosamine supplémentaire avec le lipide X, par l'intermédiaire d'une liaison $\beta(1'-6)$ [Bulawa, 1984 ; Ray, 1984].

Pour les étapes suivantes, dites "tardives", la synthèse se poursuit au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne. Ainsi, au cours de la quatrième étape, le

Etude bibliographique

A. Les LPS

disaccharide est phosphorylé en position 4' par la kinase LpxK, ce qui génère le lipide IV_A [Ray, 1987 ; Figure 6].

b. Ajout des premiers sucres du noyau

A partir du carbone 6' du lipide IV_A, la transférase bi-fonctionnelle WaaA ajoute un nombre variable ($n = 1$ à 4) de molécules de sucres Kdo, pour obtenir un Kdo_n-lipide IV_A [Clementz, 1991 ; White 1999].

c. Fin de l'acylation du lipide A

Des résidus lauréates (C12:0) et myristates (C14:0) portés par l'ACP, peuvent être ajoutés sur le lipide IV_A, lié à un ou plusieurs résidus Kdo par deux acyltransférases tardives, respectivement une lauroyl transférase (LpxL) et une myristoyl transférase (LpxM). Ces dernières étapes permettent la finalisation de la synthèse du lipide A qui est d'ores et déjà associé à un noyau minimal constitué par les unités de Kdo (Kdo_n-lipide A).

2. Finalisation de la biosynthèse du noyau et transfert du LPS "*rough*"

Le lipide IV_A modifié par l'ajout de Kdo et d'acides gras secondaires reçoit ensuite les monosaccharides supplémentaires pour former le noyau définitif. De manière schématique, les premiers monosaccharides ajoutés sont des heptoses et constituent avec le Kdo le noyau proximal, tandis que les derniers monosaccharides ajoutés sont des hexoses et constituent le noyau distal servant de point d'attache à la chaîne O. Ces additions aboutissent à l'obtention d'un LPS "*rough*". Ce dernier est alors transloqué vers la face périplasmique de la membrane interne par un transporteur de la famille des "*ATP-Binding Cassette*", la LPS-flippase MsbA [Doerrler, 2004].

Etude bibliographique

A. Les LPS

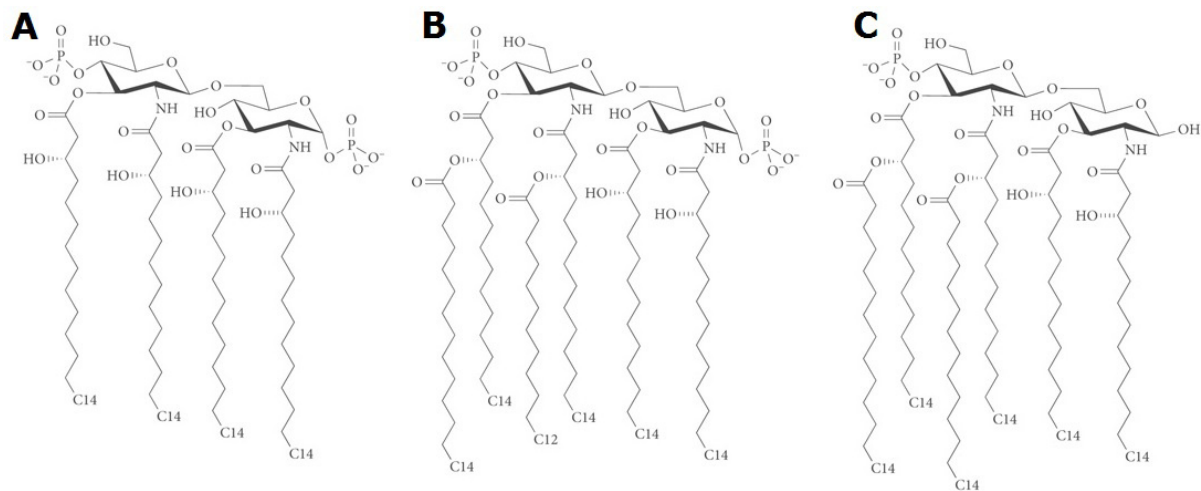


Figure 6. Formules des structures chimiques du lipide IV_A et de différents lipides A.

A. Lipide IV_A.

B. Lipide A de LPS Escherichia coli.

C. Lipide A de LPS Salmonella enterica serovar minnesota. Adapté de Bryant, 2010.

3. Biosynthèse de la chaîne O

L'ensemble des enzymes intervenant dans cette biosynthèse sont codé par des gènes regroupés au sein d'un même locus dans l'opéron *rfb*. Ce processus enzymatique se déroule selon le schéma général suivant (Figure 7) :

- synthèse des monosaccharides et liaison à un Nucléotide DiPhosphate (NDP). Cette étape est assurée par des enzymes cytoplasmiques ;
- transfert de monosaccharides depuis leurs NDP vers l'undécaprényl-phosphate (Und-P) pour former une sous-unité. L'Und-P est un lipide porteur ancré dans le feuillet cytoplasmique de la membrane interne et baptisé "*Antigen Carrier Lipid*" (ACL) ;
- synthèse de la chaîne O complète à partir des sous-unités, soit côté cytoplasmique, soit côté périplasmique de la membrane interne. Cette dernière étape peut suivre deux voies différentes par leur séquence, leur localisation et les protéines mises en jeu [Raetz, 2002].

Etude bibliographique

A. Les LPS

a. Synthèse de monosaccharides liés à un Nucléotide DiPhosphate (NDP)

Cette étape est assurée par des enzymes cytoplasmiques. Les monosaccharides synthétisés, ainsi que le NDP les liant (UDP, GDP...) varient en fonction de la souche bactérienne.

b. Formation des sous-unités O à partir des nucléotides

Les sous-unités O sont le résultat de l'assemblage des monosaccharides transférés depuis leur NDP sur l'Und-P. Un premier NDP-monosaccharide est pris en charge par une transférase enchâssée dans la membrane interne, qui va initier la synthèse de la sous-unité en O en fixant le monosaccharide phosphate du NDP à l'Und-P par une liaison pyrophosphate (formation d'un Und-P-P-monosaccharide). Un autre sucre est ensuite transféré à partir de son nucléotide vers le monosaccharide déjà fixé à l'Und-P, auquel il se fixe par une liaison osidique sous l'action d'une glycosyl transférase soluble. Cette étape se répète jusqu'à formation complète du complexe Und-P-P-sous-unité O.

c. Polymérisation des sous-unités osidiques et transfert vers la face périplasmique de la membrane interne

Il existe deux voies possibles pour ces deux processus de polymérisation et de transfert [Raetz, 2002]: la voie dépendant de Wzy et la voie dépendante du transporteur ABC.

La voie dépendante de Wzy donne des chaînes O faites de sous-unités O ramifiées et composées de monosaccharides différents. Dans cette voie, les complexes Und-P-P-sous-unité O sont préalablement exportés à la face périplasmique de la membrane interne par la flippase Wzx avant la polymérisation. Une fois exporté, un complexe Und-P-P-sous-unité O est pris en charge par la polymérase Wzy qui détache la sous-unité O du complexe et la lie alors à l'extrémité non-réductrice d'un autre complexe Und-P-P-sous-unité O pour former un Und-P-P-(sous-unité O)₂. Le dimère (sous-unité O)₂ est à son tour séparé du

Etude bibliographique

A. Les LPS

complexe par Wzy pour être fixé à l'extrémité non-réductrice d'un nouveau complexe Und-P-P-sous-unité O [Bray, 1967; Robbins, 1967]. Enfin la protéine Wzz, dernier chaînon de cette voie, régule l'activité de la polymérase Wzy et commande la fin de la polymérisation. Wzz conditionne donc le nombre de sous unités intégrées et par là même la longueur de la chaîne O [Batchelor, 1991].

La voie dépendante des transporteurs ABC donne des LPS dont les chaînes O sont des homopolymères, consistant en la répétition du même type de sous-unité O non ramifiée et constituées d'une seule espèce saccharidique mais pouvant comporter plusieurs types de liaisons osidiques. A l'inverse de la voie Wzy, la polymérisation a lieu ici dans le cytoplasme avant l'exportation à la face périplasmique de la membrane interne de la chaîne O finalisée. Cette voie nécessite pour son initiation la présence d'un Und-P-P-monosaccharide spécifique : l'Und-P-P-N-acétylglucose formé sous l'action de l'enzyme WecA et qui sert d'amorce à la suite des réactions. Un monosaccharide adaptateur est lié au N-acétylglucose ancré à la membrane par l'Und-P-P. C'est à partir de ce socle Und-P-P-amorce-adaptateur que la polymérisation des sous-unités O proprement dites peut avoir lieu sous l'action des WbdB et WbdA, qui assurent alternativement la formation de liaisons osidiques de type (1-3) et (1-2). La polymérisation s'achève finalement par l'adjonction d'un monosaccharide "terminateur de chaîne" [Whitfield, 1997]. Cette voie se termine par la translocation de la chaîne O vers la face périplasmique de la membrane interne grâce à un transporteur ABC constitué d'une protéine membranaire (Wzm) et d'une protéine hydrophile (Wzt) qui lie l'ATP [Rocchetta, 1997].

4. Fusion de la chaîne O sur le complexe moléculaire noyau-lipide A

Quelle que soit la voie adoptée par la bactérie pour synthétiser sa chaîne O, c'est la protéine WaaL qui va détacher cette chaîne de son ancrage membranaire à l'Und-P et la lier au dernier sucre du LPS "*rough*" préalablement synthétisé et transporté sur la face périplasmique de la membrane interne [Klena, 1993].

Etude bibliographique

A. Les LPS

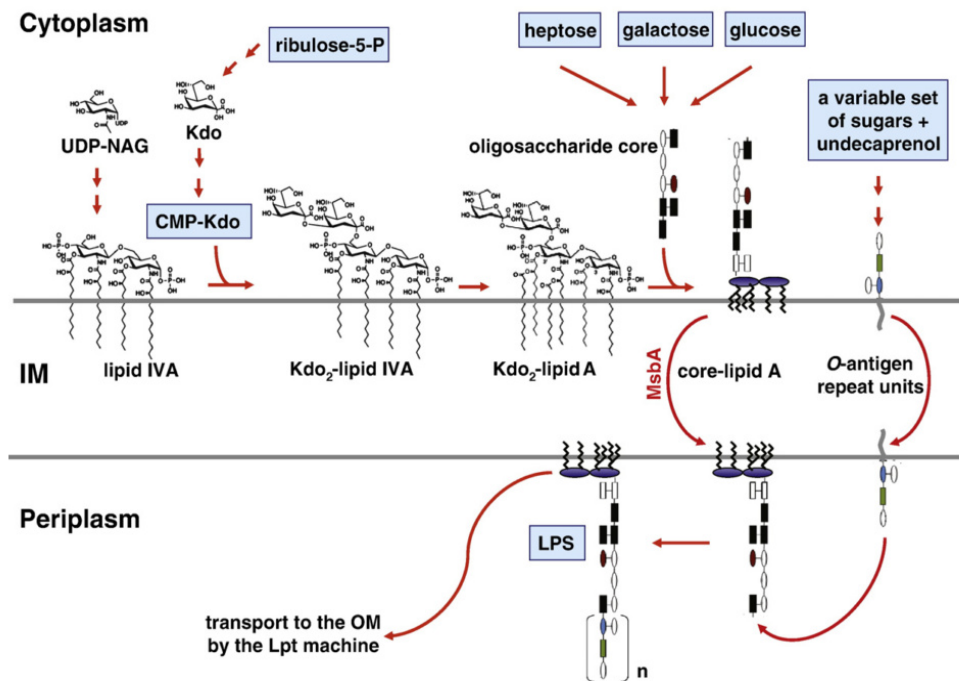


Figure 7. Schéma d'ensemble de la voie de biosynthèse du LPS. *IM : membrane interne (ou Internal Membrane). D'après Sperandeo, 2009.*

5. Transfert des LPS vers la face extracellulaire de la membrane externe

Cette étape finale met en œuvre la voie Lpt (*LPS transport pathway*) [Sperandeo, 2009 ; Ruiz 2009 ; Figure 8]. Dans une première phase, le LPS nouvellement formé est extrait de la membrane interne par un transporteur de type ABC constitué des deux protéines transmembranaires LptF et LptG, de LptB, une protéine dimérique et cytoplasmique dont l'activité ATPase fournit l'énergie nécessaire à l'extraction du LPS, et enfin de LptC, une protéine ancrée à la membrane interne dont le rôle probable est d'amarrer LptA depuis l'espace périplasmique. Dans une seconde étape, LptA lie le LPS et assure son transport dans le périplasme, vraisemblablement au travers de la paroi de peptidoglycane, bien que ce phénomène soit encore mal compris. Dans une dernière phase, le LPS est pris en charge par le complexe LptD/LptE dont la structure tridimensionnelle, récemment élucidée [Dong, 2014], forme le canal transmembranaire le plus large connu à ce jour. Ce canal permet le passage des LPS au travers de la membrane externe dont le

Etude bibliographique

A. Les LPS

feuillet externe sert finalement d'ancrage aux LPS, qui se retrouvent en contact avec le milieu extracellulaire.

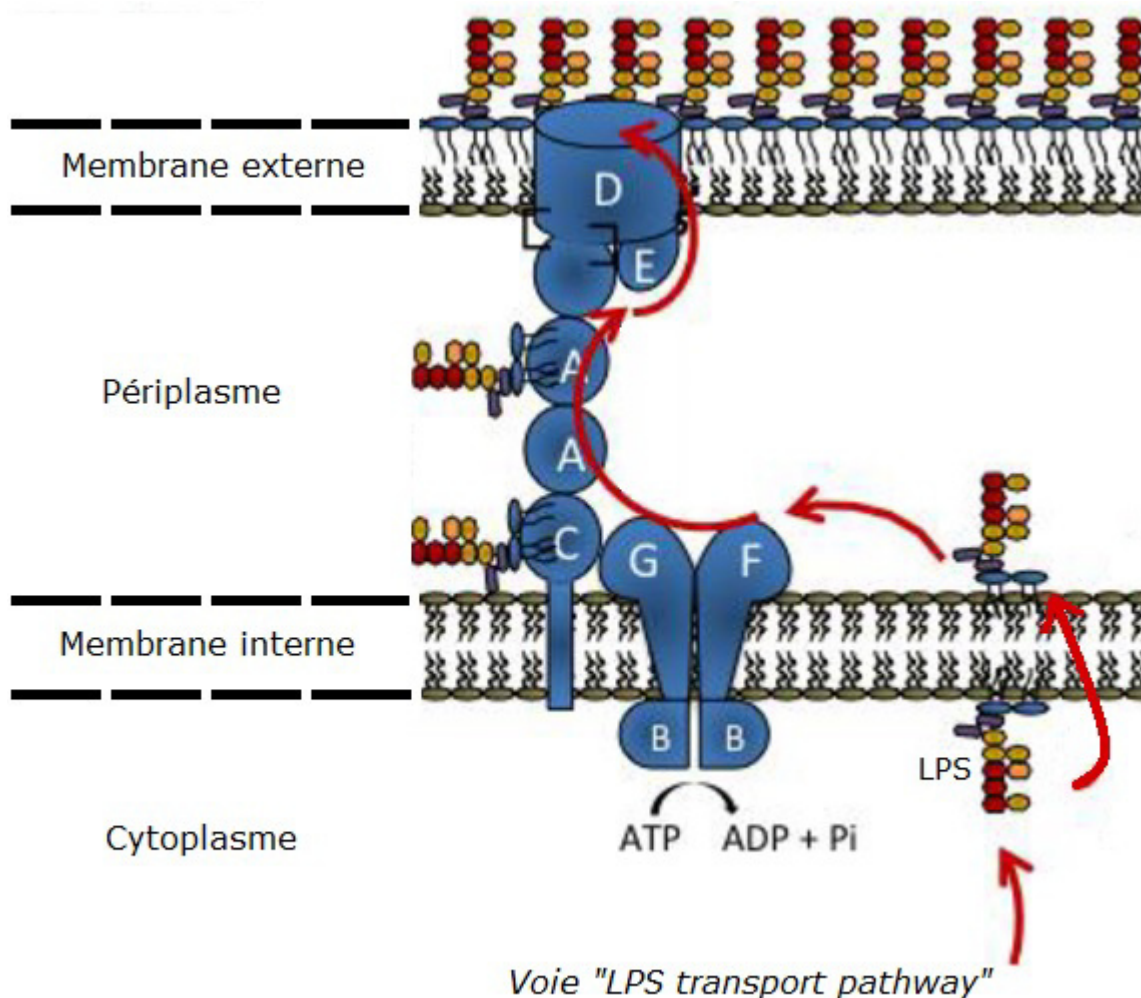


Figure 8. Représentation du transfert des LPS vers la face extracellulaire de la membrane externe par la voie "*LPS transfert pathway*". Les protéines Lpt A, B, C, D, E, F et G apparaissent en bleu. Adapté de Polissi, 2014.

6. Variations inter-espèces et modifications de structures des LPS

Les LPS sont des molécules présentant une immense variabilité de structures entre espèces mais également au sein d'une même espèce ou d'une même souche. Cette variabilité touche aussi bien la partie lipide A que la partie saccharidique des LPS.

Etude bibliographique

A. Les LPS

a. Variations du lipide A

La diversité des LPS tient pour une grande part à la composition en acides gras du lipide A. Cette diversité est le fait des acyltransférases précoces et tardives, notamment LpxA et LpxD qui ont un haut degré de spécificité pour leur substrat, celui-ci variant en fonction de la souche bactérienne. Ainsi en fonction de la souche bactérienne, ce sera un acide gras plutôt qu'un autre qui sera transféré par ces enzymes sur la future molécule de lipide A. Par exemple, chez *Escherichia coli* (*E. coli*), l'acyltransférase LpxA transfère l'acide bêta-hydroxymyristate (C14-OH) alors que la même enzyme chez *Pseudomonas aeruginosa* catalyse le transfert sélectif de l'acide bêta-hydroxydécanoïque (C10-3OH). Les acyltransférases tardives sont également sources de variations : chez *E. coli*, elles ne peuvent fonctionner que si le disaccharide de Kdo a été ajouté au lipide IV_A, alors que les mêmes enzymes chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria meningitidis* fonctionnent sans que cet ajout ait eu lieu.

En outre, toutes les bactéries à Gram-négatif ne disposent pas de ces deux acyltransférases tardives. Dans certaines souches bactériennes, on peut également observer la formation de squelettes osidiques portant différentes combinaisons d'acides gras. Cette diversité est le fait d'une moindre sélectivité des acyltransférases LpxA et LpxD.

Outre la composition en acides gras, le lipide A peut posséder un nombre variable de Kdo en fonction de l'espèce bactérienne [Clementz, 1991 ; White, 1999]. Le nombre de Kdo ajoutés est fonction de la présence ou de l'absence d'une autre kinase, la KdkA, capable d'incorporer un phosphate à la place du Kdo suivant, ou de Kdo hydrolases (KdoH) en mesure de cliver les Kdo ajoutés [White, 1999].

Un dernier paramètre de variation du lipide A concerne le degré de phosphorylation. Généralement, le lipide A est bis-phosphorylé. Toutefois, il est mono-phosphorylé chez certaines espèces telles que *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Leptospira interrogans*, *Rhizobium etli* ou *Francisella tularensis*. L'amputation d'un des deux phosphates du lipide A est le fait de deux phosphatases : la 1-phosphatase LpxE [Tran, 2004] et la 4'-phosphatase LpxE [Wang, 2006].

Etude bibliographique

A. Les LPS

En plus de ces variations inter-espèces, la structure chimique du lipide A peut encore être modifiée par des enzymes, après incorporation du LPS à la surface de la bactérie, en réponse à des stress environnementaux (changement du mode de culture : biofilm ou suspension ; changement de température...etc.). Ces modifications de la structure du lipide A peuvent se traduire par l'ajout d'acides gras insaturés, l'hydroxylation en position 2 d'un myristate secondaire, ou encore l'élimination d'un résidu acyloxyacyl. Par exemple, chez certaines bactéries comme *E. coli*, une troisième acyltransférase tardive, LpxP, peut-être induite par des températures de culture inférieures à 12°C. Cette enzyme insère en position 2' un résidu palmitoléate (C16:1) à la place du résidu lauréate. Cet échange d'un acide gras saturé contre un autre insaturé permet à la bactérie de compenser l'effet du froid en augmentant la fluidité de sa membrane [Carty, 1999]. En revanche, chez *Salmonella*, il existe une hydroxylase LpxO sous la dépendance du pH et de la concentration en ions magnésium. Cette enzyme, une fois activée, est capable d'ajouter un hydroxyle en position 2 d'un myristate secondaire [Gibbons, 2005].

Des modifications de la structure du lipide A sont également une nécessité pour les bactéries qui ont la caractéristique de passer du milieu extérieur au milieu intérieur humain ou animal. Ce changement radical d'environnement les oblige à s'adapter pour survivre : dans ce cas, les changements de structure du lipide A ont pour but de tromper la reconnaissance des LPS par le système immunitaire. Cette stratégie de camouflage des bactéries fait essentiellement intervenir deux systèmes [Guo, 1997] :

- l'un est composé d'enzymes latentes capables de modifier l'acylation du lipide A : c'est le système PhoP/PhoQ. PhoP est un facteur de transcription dont la production est principalement corrélée à la détection par la protéine PhoQ de variations de concentrations en magnésium ou à la présence de peptides microbiens cationiques [Bader, 2005] ;
- l'autre est composé d'enzymes latentes capables de greffer différents résidus aux phosphates du lipide A : c'est le système PmrA/PmrB. Le facteur de transcription PmrA est activé en fonction des concentrations ferriques et du pH détectés par la protéine PmrB [Raetz, 2007]. Par conséquent, la bactérie devient plus résistante aux

Etude bibliographique

A. Les LPS

antibiotiques polycationiques comme la polymyxine B. Il est notable que l'activation du système PmrA/PrmB peut se faire indirectement par le système Phop/PhoQ.

b. Variations de la chaîne O

En tant qu'élément le plus distal des molécules de LPS, la chaîne O est directement à l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Ainsi, la chaîne O constitue un site de reconnaissance privilégié pour le système immunitaire mais joue également de ce fait un rôle prépondérant dans les mécanismes de résistance et d'échappement de la bactérie vis-à-vis des systèmes de défense de l'organisme hôte. De plus, la chaîne O joue un rôle clé dans les phénomènes de mimétisme antigénique et d'adhérence aux tissus de l'hôte. De par tous ces rôles, la chaîne O constitue un des paramètres majeurs influençant la virulence des bactéries Gram-négatif, dont les fonctions adaptatives aboutissent à une immense diversité inter-espèces et intra-espèce de ladite chaîne O. Outre la multitude de monosaccharides potentiellement disponibles, présents ou absents selon les espèces [Jansson, 1999], cette hétérogénéité est liée aux variations des modalités de synthèse de la chaîne O, aussi bien dans les étapes initiales que tardives.

Ainsi, au stade précoce, la transférase impliquée dans l'arrimage du premier sucre à l'Und-P est variable en fonction de la souche bactérienne [Meier-Dieter, 1992 ; Wang, 1996 ; Rocchetta, 1998] ; c'est par exemple la transférase WbaP qui est présente chez les *Salmonella* du sérotype B [Katzenellenbogen, 2009].

Au stade de la polymérisation, l'existence des voies Wzy et/ou ABC est une des causes de la variabilité structurelle des LPS d'une souche bactérienne à l'autre. En effet, selon la voie empruntée, la chaîne O sera différente. Néanmoins, certaines bactéries utilisent simultanément ces deux voies, ce qui entraîne la production de deux chémotypes de LPS différents au sein de la même bactérie [Rocchetta, 1998]. En outre, au sein même de la voie Wzy, le nombre de sous-unités intégrées, et par conséquent la longueur de la chaîne O, sont sous le contrôle de Wzz et peuvent donc varier [Batchelor, 1991].

Enfin, concernant la voie ABC, le sucre terminateur de chaîne est variable en fonction de l'espèce bactérienne.

L'impact de la variabilité de la chaîne O sur la résistance des bactéries au système de défense de l'organisme hôte peut être illustré par la relation entre les caractéristiques de cette chaîne et l'efficacité du système du complément.

c. Implication de la chaîne O dans l'interaction du LPS avec le système du complément

Le système du complément, partie prenante de l'immunité innée, est constitué d'enzymes sériques (C1 à C9), qui après une activation en cascade, forment un complexe moléculaire. Il s'agit du complexe d'attaque membranaire (ou *Membrane Attack Complex*, MAC) dont la fonction est de lyser la bactérie par formation d'un canal au travers de sa membrane externe [Kemper, 2007]. Le système du complément est basé sur trois stades d'activation et d'association des enzymes sériques, essentiels à la formation du MAC :

- l'activation de C3 en C3b par une C3-convertase. C3b permet de marquer (opsonisation) les bactéries en se fixant à leur surface. L'opsonisation permet la poursuite de la cascade du complément en activant une C-5 convertase. Les bactéries opsonisées peuvent également être directement reconnues et phagocytées par les cellules immunitaires porteuses du récepteur à C3b (récepteur CR1) ;
- l'activation de C5 en C5b par la C5-convertase ;
- la fixation de C5b aux chaînes O des LPS. Ainsi fixé, C5b s'associe à C6, C7, C8 et à plusieurs copies de C9 pour former le MAC dans la membrane externe. L'augmentation de la perméabilité engendrée par ce pore aboutit à une déstabilisation de la membrane cytoplasmique de la bactérie à Gram-négatif, à sa lyse, puis à sa mort [Salysers, 2002].

L'activation de C3 et C5 constitue donc deux étapes essentielles dans la mise en route du système du complément. Ces deux activations nécessitent respectivement la formation de la C3-convertase et de la C5-convertase. Ces deux enzymes peuvent être produites par trois voies différentes (Figure 9) :

Etude bibliographique

A. Les LPS

- la voie classique ;
- la voie alterne ;
- la voie des lectines.

Toutes ces voies nécessitent l'interaction avec les LPS à la surface des bactéries.

i. La voie classique

Elle implique le facteur C1. Celui-ci peut être activé de deux façons différentes :

- par une interaction directe de son unité de reconnaissance C1q avec le lipide A du LPS [Cooper, 1978 ; Zohair 1989]. Ce type d'interaction est inhibé dans le cas de LPS ayant une chaîne O longue (*Smooth LPS*), celle-ci rendant le lipide A moins accessible pour C1q [Morisson, 1977] ;
- par son interaction au niveau de la région Fc d'un anticorps (classe IgM, IgG1 ou IgG3) formant un complexe immun anticorps/antigène à la surface des bactéries. Ce type d'interaction est favorisé dans le cas de LPS ayant une chaîne O longue, celle-ci constituant un antigène facilement accessible aux Ig.

Dans les deux cas, C1 activé permet le clivage de C2 et C4 pour former la C3-convertase (association des fragments C4b et C2a), puis de la C5-convertase (association des fragments C4b, C2a et C3b).

ii. La voie alterne

Elle implique divers composants de surface des micro-organismes, notamment la chaîne O des LPS chez la bactérie à Gram-négatif. En effet, C3b est constitutivement présent sous forme soluble dans le sérum du fait de l'hydrolyse spontanée de C3. Cette présence constitutive de C3b est infime, mais néanmoins suffisante pour que son interaction avec la chaîne O des LPS déclenche cette voie [Betz, 1981 ; Cooper, 1978 ;

Etude bibliographique

A. Les LPS

Loos, 1974 ; Morisson, 1977 ; Vukajlovich, 1986]. Une fois activé par la chaîne O des LPS, C3b constitutif va, en présence de trois facteurs sériques (facteur B, D et properdine), déclencher une boucle d'amplification aboutissant à l'augmentation du pool de C3b selon les modalités de la voie classique.

iii. La voie des lectines

Elle implique la lectine liant le mannose (ou *Mannose Binding Lectin*, MBL). Cette protéine de la famille des collectines est capable de reconnaître les résidus mannose et N-acétylglucosamine, notamment ceux de la chaîne O des LPS [Zhang, 1999]. Cette reconnaissance de motifs osidiques par la MBL active les sérines protéase sériques qui lui sont associées (*MBL-Associated Perine Protease* : MASP1 et MASP2). Une fois activées, ces sérines protéases peuvent utiliser C2 et C4 pour produire la C3-convertase et la C5-convertase comme le ferait C1 activé. Il est intéressant de noter que les ficolines, qui sont des protéines sériques appartenant également à la famille des collectines, sont susceptibles de jouer le même rôle que la MBL.

Etude bibliographique

A. Les LPS

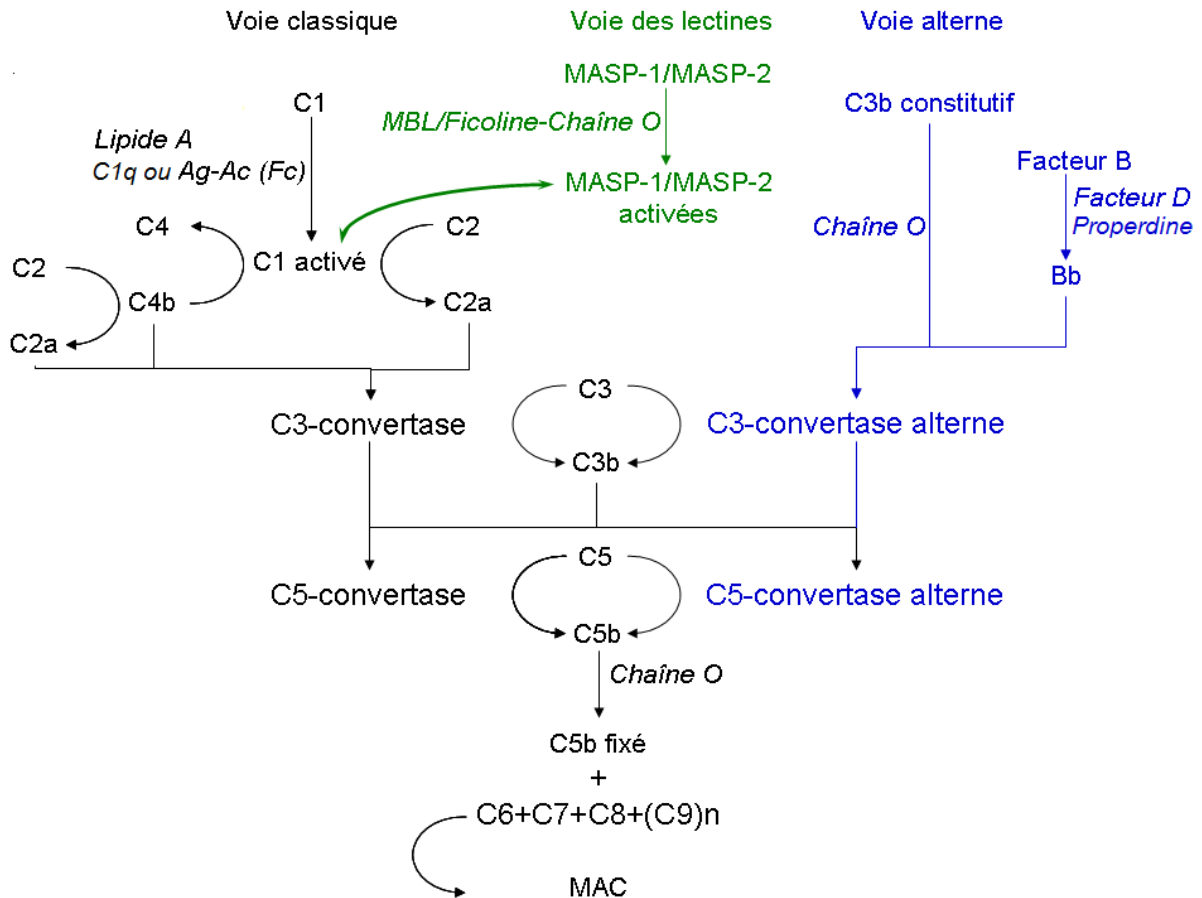


Figure 9. Schéma de synthèse des trois voies d'activation du système du complément par les LPS. Adapté de Punzi, 2013.

En résumé, la voie d'activation déclenchée par la chaîne O du LPS dépend de sa longueur [Vukajlovich, 1986]. Les LPS à chaîne O courte (Re-LPS) activent le complément principalement par la voie classique, même en l'absence d'anticorps, tandis que les LPS à chaîne O longue peuvent l'activer par la voie classique (complexe immun Ig/chaîne O), alterne (interaction C3b/chaîne O), ou par la voie des lectines (interaction MBP/sucres spécifiques de la chaîne O). Toutefois, il existe un seuil de taille, à savoir trois résidus osidiques, au-delà duquel le pouvoir d'activation de la voie alterne reste constant. Il est important de noter que des chaînes O seules (issues du clivage de LPS actifs dans la voie alterne), tout comme les LPS dont le lipide A est lié par la polymyxine B ou déacylé, sont incapables d'initier cette voie alterne [Yokochi, 1990 ; Mey 1994]. Ces observations valent seulement pour les chémotypes de LPS issus d'une même souche bactérienne. En effet, d'une souche à une autre, la composition de la chaîne O du LPS varie. Or leur composition

Etude bibliographique

A. Les LPS

est une variable qui influe également sur la capacité des LPS à activer l'une ou l'autre des voies du complément [Grossman, 1984 ; Grossman, 1990]. Ainsi, des LPS dont la chaîne O est particulièrement riche en résidus mannose et N-acétylglucosamine sont des cibles de choix pour la voie des lectines.

La longueur et la composition de la chaîne O des LPS sont donc des facteurs essentiels déterminant les modalités de l'activation du système du complément. De plus, il existe une autre composante de la réponse immunitaire innée à l'infection bactérienne sensible à la longueur de la chaîne polysaccharidique du LPS : la phagocytose des bactéries par les cellules phagocytaires [Salysers, 1994]. En effet, la présence de la chaîne O chez les bactéries de souches sauvages "*smooth*" rend leur phagocytose plus difficile que chez les bactéries mutantes "*rough*" [Liang-Takasaki, 1982]

V. Agrégabilité des LPS

Les LPS sont des molécules amphiphiles, qui s'agrègent en milieu aqueux. Elles forment alors des édifices supramoléculaires dont l'architecture est fonction de la concentration de LPS. Cette propriété des LPS à s'organiser par auto-assemblage en milieu aqueux les classent dans la grande famille des cristaux liquides ou mésogènes.

1. Introduction aux cristaux liquides ou mésogènes

Durant la quasi-totalité du XIX^{ème} siècle, l'étude de la matière s'est faite au travers d'une description ternaire de ses états : solide, liquide et gazeux. Pourtant, en 1889, le botaniste autrichien Friedrich Reinitzer observe deux points de fusion du benzoate de cholestérol. Ce dernier communique sa découverte à Otto Lehmann, physicien allemand, qui la confirme, et propose d'enrichir le modèle descriptif de la matière, en y introduisant un nouveau concept : celui de cristaux fluides. Cette terminologie évolue vers l'expression cristal liquide en 1900, puis vers le terme mésophase (*méso* est un terme grec signifiant "intermédiaire") en 1922.

Etude bibliographique

A. Les LPS

2. Deux terminologies : cristaux liquides/état cristal liquide versus mésogène/mésophase

Le terme de mésophase (ou état mésomorphe) décrit l'état physico-chimique que peuvent adopter certains matériaux, tandis qu'on parlera de mésogènes pour qualifier les molécules à l'origine de la mésophase.

C'est le degré d'organisation moléculaire qui distingue les différents états de la matière :

- les solides sont constitués de molécules immobiles, qui conservent donc un ordre de position et un ordre d'orientation ;
- les gaz sont composés de molécules indépendantes les unes des autres et donc complètement mobiles ;
- les liquides présentent des molécules constitutives, qui sont dans un état intermédiaire entre le solide et le gaz. Elles sont mobiles mais conservent une interdépendance.

Dans la famille des fluides, qui regroupe les liquides et les gaz, l'ordre, la position et l'ordre d'orientation des molécules constitutives sont aléatoires. Au contraire, dans les mésophases (ou états mésomorphes), état intermédiaire entre le cristal et le liquide, les molécules constitutives, dites mésogènes, possèdent une certaine mobilité comme dans les liquides. Cependant, elles conservent, comme dans les solides, un certain degré d'organisation. Alors qu'on distingue par les notions de mésophase et de mésogènes, respectivement l'état physico-chimique et les molécules élémentaires constitutives de cet état, la notion de cristal liquide quant à elle se réfère autant à l'état physico-chimique (on parle alors d'état cristal liquide), qu'aux molécules élémentaires constitutives de cet état.

3. Les grandes familles de mésogènes : thermotropes et lyotropes

Il existe trois grandes familles de mésogènes :

Etude bibliographique

A. Les LPS

- certains ne s'organisent en mésophase qu'au-delà de leur température de fusion et jusqu'à une température maximum. Ces composés sont dits thermotropes. L'architecture supramoléculaire adoptée par les mésogènes thermotropes dépend de la température et de la pression ;
- d'autres mésogènes s'auto-assemblent après dispersion dans un solvant. Il s'agit des mésogènes lyotropes. Ces composés adoptent différents arrangements supramoléculaires en fonction de leur concentration dans un solvant ;
- les mésogènes qui sont à la fois thermotropes et lyotropes sont dits amphotropes.

4. Du mésogène au complexe supramoléculaire

La plupart des composés organiques ne sont pas des mésogènes. En effet, la formation de mésophase ne peut se produire qu'avec des molécules pourvues d'une forme et/ou de propriétés physico-chimiques dissymétriques.

a. Dissymétrie de forme

Selon leur forme, les mésogènes se répartissent selon quatre grandes familles :

- les mésogènes calamitiques qui présentent une forme de bâtonnet ;
- les mésogènes discotiques dont la forme s'apparente à celle d'un disque ;
- les mésogènes sanidiques dont la forme rappelle celle d'une planche de surf ;
- les mésogènes avec des formes plus complexes. Par exemple, certains ont la forme de cônes ou de bananes.

Certaines caractéristiques structurales des molécules amphiphiles permettent de prédire le type d'arrangement supramoléculaire qui sera formé. Trois aspects structurels peuvent être pris en compte pour prédire l'architecture supramoléculaire qui sera adoptée par une molécule amphiphile donnée :

- la taille de sa tête polaire ;
- la longueur totale de la molécule ;

- le volume qu'elle occupe.

b. Dissymétrie de propriétés physico-chimiques

La dissymétrie des propriétés physico-chimiques des mésogènes est le résultat de la présence de groupements chimiques aux propriétés antagonistes au sein d'une même molécule. Ainsi, un mésogène peut présenter une région rigide et une région souple, ou bien encore une partie hydrophobe et une autre hydrophile. Ce dernier antagonisme de propriétés physico-chimiques au sein d'une même molécule, à savoir hydrophobe versus hydrophile, constitue le cas des molécules amphiphiles. Ces dernières font parties des mésogènes lyotropes. En effet, lorsque des molécules amphiphiles sont dissoutes dans un solvant, elles s'organisent spontanément en complexes supramoléculaires par reconnaissance de leurs parties affines. C'est notamment le cas des LPS.

c. Impact de la nature du solvant et de la concentration de la molécule amphiphile sur son organisation supramoléculaire

Globalement, plus la concentration de la molécule amphiphile sera élevée plus la mésophase sera ordonnée. Réciproquement, plus la concentration sera faible et plus la mésophase sera désordonnée.

Concernant le solvant, il agira principalement sur l'organisation supramoléculaire des molécules amphiphiles qui y sont dissoutes, selon :

- sa polarité : Il aura donc soit une plus grande affinité pour la partie hydrophobe du mésogène (cas des solvants apolaires), soit une plus grande affinité pour la partie hydrophile (cas des solvants polaires). C'est donc en fonction de la polarité du solvant que se fera l'orientation de la molécule amphiphile à l'interface solvant-complexe supramoléculaire ;
- sa proticité (capacité d'un solvant à donner un proton). Ce concept est donc une extension du concept de l'acidité selon Brönsted. La proticité agit directement sur les groupements chargés des molécules amphiphiles (groupements carboxyliques

Etude bibliographique

A. Les LPS

des sucres, groupements amines, groupements phosphates et groupements pyrophosphates), influant sur les forces de répulsion et/ou d'attraction entre ces molécules, ainsi que sur leur capacité à former des ponts ioniques intermoléculaires en présence d'ions multivalents.

5. Un cas concret de mésogène lyotrope pourvu d'une structure amphiphile : le LPS

L'association des molécules de LPS met en jeu des interactions intermoléculaires hydrophobes et hydrophiles. L'organisation des LPS en édifices supramoléculaires se faisant en fonction de leur concentration, la notion de Concentration Micellaire Critique (CMC) ou Concentration d'Agrégation Critique (CAC) revêt une importance notable. La CAC peut être définie comme la concentration de LPS à partir de laquelle ce dernier va s'organiser par auto-assemblage pour former des complexes supramoléculaires. Pour des valeurs de concentration de LPS inférieure à la CAC, on observera majoritairement une organisation des LPS sous forme de micelles. Dans ce cas, une micelle correspond à l'association d'une dizaine de molécules de LPS dont le temps d'association moyen est de l'ordre de 10^{-4} secondes. Tandis qu'au dessus de la CAC, les molécules de LPS s'associent en édifices supramoléculaires plus imposants avec un temps de d'association moyen de plusieurs heures et dont l'architecture dépend de différentes variables [Israelachvili, 1991].

La typologie des architectures supramoléculaires formées par les LPS est définie selon deux critères :

- la forme sphérique (micellaire/vésiculaire) ou réticulaire des complexes supramoléculaires (Figure 10) ;
- le degré d'organisation entre les complexes supramoléculaires.

Alors que la tendance des LPS à former des complexes supramoléculaires sphériques ou réticulaires dépend de leurs formes, de leurs propriétés physico-chimiques et de la nature du solvant ; le degré d'organisation entre les complexes supramoléculaires dépend quant à lui essentiellement de la concentration du LPS dans le solvant.

Etude bibliographique

A. Les LPS

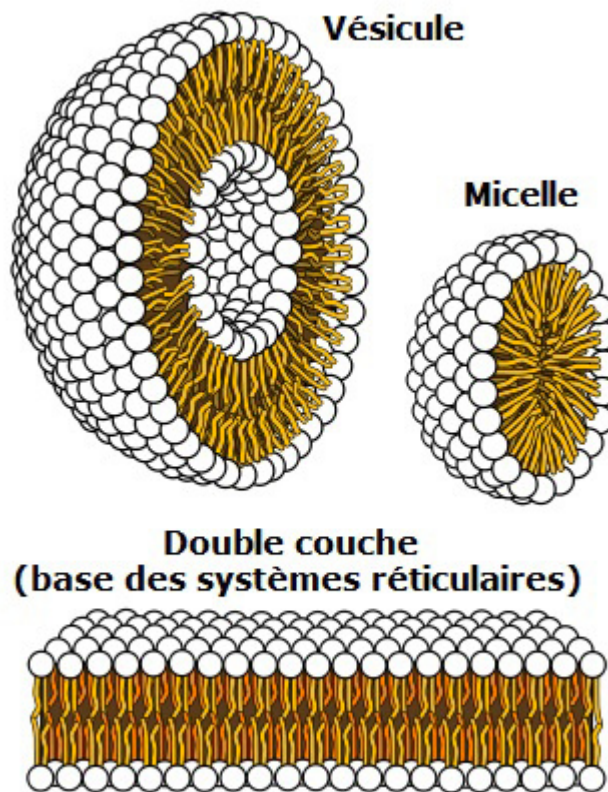


Figure 10. Représentation tridimensionnelle des trois aspects des complexes supramoléculaires de LPS : vésicule, micelle ou réticulaire. *Adapté de Wikipédia.fr.*

En plus des interactions intermoléculaires de type hydrophobe ou hydrophile, l'association des molécules de LPS met également en jeu des liaisons ioniques formées entre des cations divalents et les groupements acides des LPS (groupements carboxyliques de certains sucres, groupement phosphates et groupements pyrophosphates).

D'ailleurs, il a été montré que la présence de cations divalents, comme les ions calcium Ca^{2+} , dans une solution de LPS Re *E. coli* affecte la conformation du noyau, l'organisation des chaînes acyles les unes par rapport aux autres (Figure 11), ainsi que leur rigidité [Obst, 1997] [Garidel P., 2005]. Cet effet est le résultat de la liaison d'un cation Ca^{2+} avec d'une part un groupement phosphate du squelette di-glucosamine diphosphorylé du lipide A et d'autre part le groupement carboxylate du sucre Kdo appartenant au noyau.

Etude bibliographique

A. Les LPS

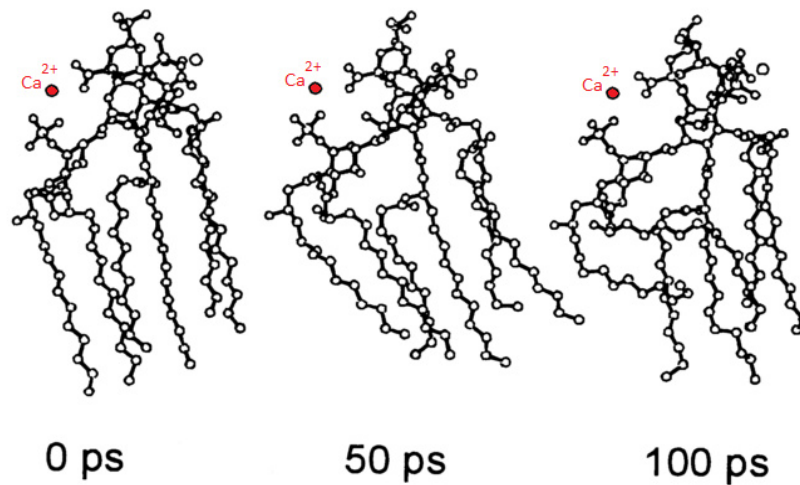


Figure 11. Arrêt sur image de la simulation du comportement du LPS Re en présence de cations calcium Ca^{2+} à 0 , 50 et 100 picosecondes après l'équilibre. Les atomes d'hydrogène ont été omis dans un souci de clarté. Adapté de Obst, 1997.

Ce réarrangement spatial des différentes parties du LPS confère à ce dernier une forme globale plutôt cylindrique ou conique. Cette forme va alors affecter l'architecture supramoléculaire que les LPS vont adopter au dessus de leur CAC. Schématiquement, la présence de cations divalents affecte donc la conformation du LPS à l'échelle monomérique, puis influence en conséquence l'agrégation des LPS vers un type de complexes supramoléculaires donné. De plus, il est remarquable que ces cations divalents agissent également à l'échelle supramoléculaire en liant les LPS entre eux après qu'ils se soient associés. Ainsi, la présence de cations divalents favorise le passage :

- de complexes supramoléculaires de type non lamellaire à lamellaire pour le LPS Re *E. coli* ;
- de complexes supramoléculaires de type lamellaire-cubique à multilamellaire pour le LPS Re de la souche bactérienne *Salmonella minnesota* mutante R595.

Préalablement au développement de cet axe plus en aval, il est d'ores et déjà pertinent de noter que la conformation du LPS, notamment celle de son lipide A, ainsi que l'architecture des complexes supramoléculaires de LPS, sont des éléments déterminants de l'activité biologique de ces molécules.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

I. Méthodes d'extraction des LPS

A la surface d'une même souche bactérienne se trouve une pluralité de chémotypes de LPS et cette hétérogénéité est encore plus grande entre souches bactériennes [Lerouge, 2002]. Le développement de techniques d'extraction des LPS se déroule donc autour d'une problématique d'universalité et de performance que l'on peut formuler de la façon suivante : Comment extraire les différents chémotypes de LPS d'une même souche bactérienne avec le meilleur rendement et sans discrimination entre eux et ce quelque soit la souche ? D'une part, l'efficacité d'une technique à extraire un LPS dépend évidemment de sa structure chimique. D'autre part, les propriétés physico-chimiques des LPS peuvent être sensiblement différentes, voir complètement opposées entre différents chémotypes. Donc, le choix d'une technique d'extraction donnée engendrera inévitablement une sélection de certains chémotypes de LPS, même à partir d'une seule et même souche bactérienne [Ridley, 2000].

La grande diversité des bactéries et l'impossibilité de développer une technique d'extraction des LPS qui soit universelle, explique donc la multitude de ces techniques. Parmi les nombreuses méthodes existantes (une vingtaine), nous décrivons plus particulièrement deux techniques basées sur le partage entre phase organique et phase aqueuse. Ces techniques exploitent la différence de solubilité entre les différents composants de la bactérie dans différents solvants organiques et/ou aqueux : Les techniques développées par Westphal et Jann [Westphal, 1965,] au phénol chaud/eau et par Gallanos and *al.* [Gallanos, 1969] au phénol/chloroforme/éther de pétrole sont les plus connues, respectivement pour l'extraction de LPS "*smooth*" et pour celle de LPS "*rough*".

1. Extraction au phénol chaud/eau

Une suspension bactérienne (1g de bactéries lyophilisées pour 20ml d'eau) chauffée à 65°C est ajoutée à un mélange phénol/eau (18ml/2ml) chauffé à 65°C. Ce mélange est agité et maintenu à 65°C durant 45 minutes, puis refroidi à environ 5°C. Le mélange est

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

ensuite centrifugé à 2000Xg durant 20min. La phase aqueuse est prélevée et stockée. La phase organique est quand à elle extraite une seconde fois avec 20ml d'eau. La seconde phase aqueuse est alors prélevée et ajoutée à la première, qui avait été stockée. L'ensemble de la phase aqueuse est alors dialysé ou filtré sur membrane pour éliminer la contamination résiduelle du phénol. Une ultracentrifugation à 300 000Xg durant 45 min à 4°C est ensuite effectuée sur la phase aqueuse filtrée et les LPS extraits sont récupérés au culot.

Cette technique comporte trois points faibles :

- Le LPS extrait est contaminé par l'antigène commun des entérobactéries, ECA [Männel, 1978] ;
- Une partie des LPS sont associés à des protéines membranaires. Cette association les rend solubles dans la phase organique. Pour récupérer cette fraction de LPS dans la phase aqueuse, un traitement à la protéine K est nécessaire [Chart, 1991] ;
- Les LPS "*smooth*" présentant des sucres hydrophobes dans leurs chaînes O répondent très mal à cette technique, car ces LPS se solubilisent dans la phase phénolique [Haseley, 1998 ; Caroff, 1984-a ; Que-Gewirth, 2004 ; Caroff, 1984-b]. Ce type de LPS "*smooth*" peut être extrait plus efficacement par la méthode d'extraction au phénol/chloroforme/éther de pétrole, mentionnée ci-dessous [Onoue, 1996] ;

2. Extraction au phénol/chloroforme/éther de pétrole

Les bactéries lyophilisées sont agitées à froid dans un mélange de solutions à 90% de phénol dans l'eau, de chloroforme et d'éther de pétrole (2:5:8 en volumes). Une centrifugation à 15 000xg durant 15 min à température ambiante est ensuite effectuée sur ce mélange. Le surnageant est prélevé et stocké. Le culot est récupéré par l'ajout du même mélange de solution organique, avant d'être extrait par une nouvelle centrifugation. Le deuxième surnageant obtenu est ajouté au premier préalablement stocké. Les solvants organiques sont évaporés à partir du surnageant. De l'eau est alors ajoutée goutte à goutte pour faire précipiter le LPS. Le précipité est récupéré dans le culot après centrifugation. Le

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

culot est lavé avec de l'éther de pétrole, puis avec de l'acétone afin d'éliminer la contamination résiduelle du phénol. Le précipité décontaminé est enfin récupéré dans le culot après ultracentrifugation à 300 000xg durant 45min à 4°C.

Les deux techniques précédemment citées ont des rendements relativement faibles et présentent, du fait de la présence de phénol concentré et chaud, le risque de cliver certains acides gras du lipide A, fixés par des liaisons esters instables [Okuda, 1975].

II. Méthodes de purification des LPS

Acides nucléiques, protéines, lipides, lipopeptides sont parmi les nombreuses molécules qui composent les extraits obtenus à partir des techniques d'extraction développées précédemment. Or, l'utilisation qui est faite des extraits de LPS supporte plus ou moins mal ces contaminants. Par exemple, bien que nécessitant quand même une purification après l'étape d'extraction, certaines techniques d'analyse structurale sont moins exigeantes que les études des effets cellulaires et physiopathologiques des LPS. Ces évaluations nécessitent en effet une pureté quasi-parfaite, pour ne pas imputer à tort certains effets des contaminants aux LPS. C'est pour s'affranchir de ces limites que les préparations commerciales sont annoncées avec des degrés de pureté s'échelonnant de 90 à 99 %. Pour atteindre ces niveaux, il est nécessaire de recourir, dans l'ordre, aux techniques de purification suivantes :

- Digestion enzymatique (DNase, RNase, protéinase K) pour l'élimination des acides nucléiques et des protéines [Sambrook, 1989] ;
- Mise en suspension fine par sonication de l'extrait sec du LPS ;
- Chromatographie d'affinité sur colonne de polymixine B-agarose [Forsberg, 1998] ;
- Extraction des résidus protéiques par mélange phénol/désoxycholate/triéthylamine [Hirschfeld, 2000] ;
- Technique de Tirsoaga [Tirsoaga, 2007]. Cette technique permet de purifier les extraits de LPS des derniers contaminants (lipoprotéines et peptidoglycanes) qui

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

peuvent être liés de façon non-covalente, mais toutefois fortement au lipide A. Elle consiste en un ou plusieurs traitements acides des extraits de LPS suivi d'étapes de sonication.

III. Méthodes de pré-analyse structurale des LPS

1. Détermination de l'hétérogénéité de l'extrait de LPS

L'analyse structurale des LPS débute par une détermination du niveau d'hétérogénéité de l'extrait purifié. Bien que dépourvu de l'essentiel des contaminants, l'extrait purifié de LPS n'en demeure pas moins hétérogène de par les nombreux chémotypes de LPS qui le constituent. Cette première étape va donc permettre de distinguer les différents types chimiques de LPS en présence, ainsi que leurs proportions relatives. Pour ce faire, il existe quatre techniques principales :

- l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE) [Tsai, 1982]. Il existe différentes variantes de cette technique qui diffèrent principalement par le type de révélation utilisée : révélation au périodate/nitrate d'argent [Tsai, 1982 ; Komuro, 1988 ; Fomsgaard, 1990 ; Kittelberger, 1993 ; Guard-Petter, 1995] ou bien immunorévélation après électrotransfert des bandes de LPS sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF [Sturm, 1984] ;
- la chromatographie sur couche mince [Caroff, 1990]. Encore une fois, il est possible de révéler les LPS séparés de plusieurs façons : révélation par un mélange d'acide isobutyrique et d'ammoniaque [Caroff, 1990] ou par la vapeur d'iode, par la ninhydrine ou par carbonisation à l'acide sulfurique ou bien par immunorévélation [Le Blay, 1997] ;
- l'électrophorèse capillaire [Freitag, 1997] ;
- la chromatographie sur colonne de silice ou d'hydroxyapatite [Le Dur, 1980].

La limite des trois premières techniques sus-citées réside dans leur résolution insuffisante pour distinguer entre des chémotypes de LPS dont les structures chimiques

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

sont trop semblables. Au contraire, la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite présente une résolution remarquable. Elle a en effet permis de séparer deux chémotypes de *Bordetella pertussis* dont les structures chimiques étaient identiques à un phosphate près sur le résidu Kdo [Le Dur, 1980].

2. Sélection d'un chémotype de LPS

A ce stade, il est nécessaire de sélectionner l'un des chémotypes de LPS dans le but de l'utiliser comme échantillon d'analyse lors d'investigations structurales plus approfondies. Cette sélection se fait en considérant le processus de purification mis en œuvre préalablement. Ainsi, dans le cas d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE), les bandes d'intérêts peuvent être isolées par coloration-décoloration [Hardy, 1997] et électro-élution [Pupo, 2000]. De la même manière, suite à une chromatographie sur couche mince les bandes d'intérêts peuvent être prélevées [Therisod, 2001]. Le chémotype d'intérêt ainsi sélectionné, la structure du LPS sera déterminée par spectrométrie de masse. L'électrophorèse capillaire permet de s'affranchir de cette étape de prélèvement, car elle peut être mise directement en circuit avec un spectromètre de masse équipé d'un système d'ionisation par électronébuliseur (ou *ElectroSpray Ionization*, ESI) permettant l'ionisation des LPS directement après leur sortie de l'électrophorèse capillaire [Lundstrom, 2008].

3. Clivage des LPS : la chaîne polysaccharidique et le lipide A

Que ce soit pour satisfaire certains choix d'étude ou bien pour répondre aux contraintes de certaines techniques d'analyse structurale, qui ne peuvent pas s'adresser à des molécules trop longues, l'hydrolyse des LPS est parfois nécessaire. Cette hydrolyse a lieu au niveau de la liaison osidique qui lie la chaîne polysaccharidique au lipide A (Figure 12). Cette liaison étant la plus fragile de toutes celles constituant les LPS, sa rupture est réalisée aisément dans des conditions d'acidité douce [Rosner, 1979 ; Caroff, 1988]. Les conditions de l'hydrolyse doivent être étroitement contrôlées pour éviter de porter atteinte

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

à l'intégrité chimique de la chaîne polysaccharidique ou du lipide A ; en clivant par exemple une liaison pyrophosphate de ce dernier.

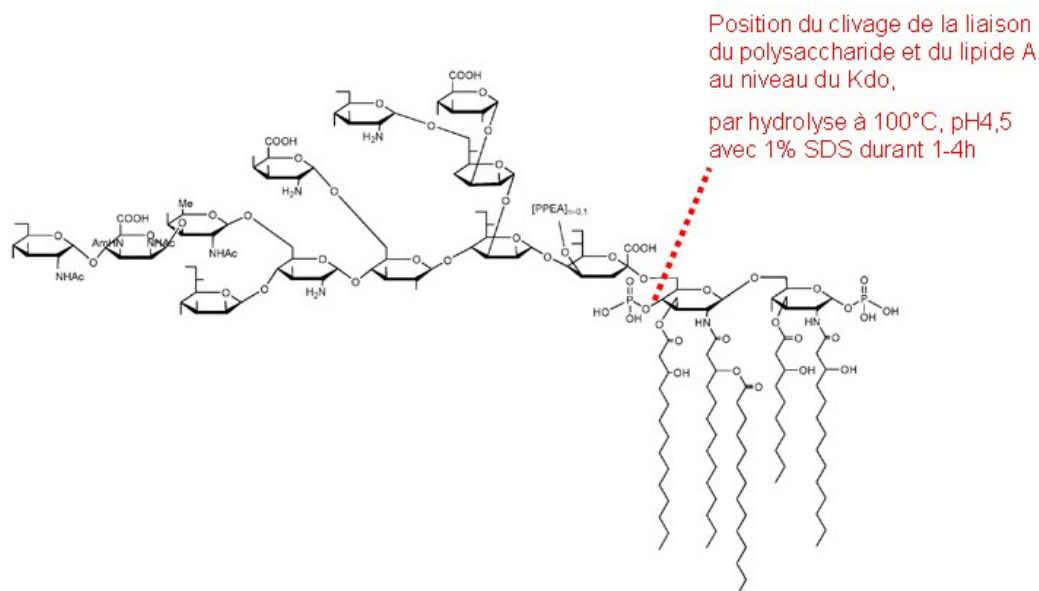


Figure 12. Schéma de la position de clivage lors de l'hydrolyse acide douce du LPS en présence de SDS. D'après Caroff, 1988.

Outre la liaison osidique du Kdo, lorsqu'il existe des liaisons aussi sensibles à l'hydrolyse acide, l'hydrolyse du diol extracyclique du Kdo peut être effectuée par le périodate de sodium en condition alcaline [Lebbar, 1995]. Ce procédé est possible seulement si le diol extracyclique du Kdo n'est pas substitué en 7 et 8 ou bien si le LPS porte un heptose qui n'est pas substitué en 6 et 7 mais l'est en position 4 par la chaîne polysaccharidique.

IV. Méthodes d'analyse massique ou structurale des LPS par spectrométrie de masse

Le principe de cette technique consiste à détecter les molécules ionisées et/ou leurs fragments ionisés en fonction du rapport de leurs masses sur leurs charges (m/z) (Figure 13). Les spectres déterminés sur la base de ce principe de détection permettent d'identifier, de quantifier, de déterminer la masse moléculaire de l'analyte ou de définir sa structure.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

Un spectromètre de masse est constitué de trois ensembles fonctionnels :

- la source, qui va ioniser et plus ou moins fragmenter l'échantillon ;
- l'analyseur, qui va séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) ;
- le détecteur, qui détecte l'abondance relative de chaque ion et amplifie le courant correspondant à ce flux d'ions jusqu'à ce qu'il soit détectable par le système électronique en aval.

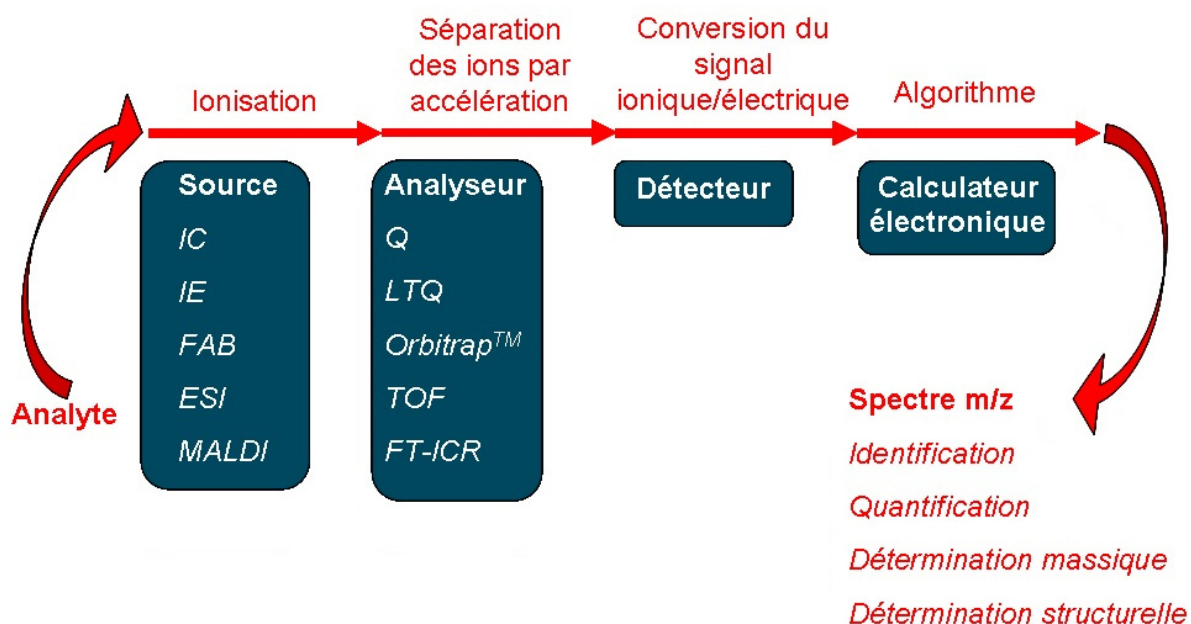


Figure 13. Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

A l'usage, la performance et le domaine d'application (quantification, détermination massique ou structurale) d'un spectromètre de masse sont essentiellement liés au type de source et d'analyseur. L'impact du détecteur sur ces deux points est usuellement considéré comme secondaire. Toutefois, il est intéressant de noter que les détecteurs actuellement disponibles sur le marché (détecteurs à conversion ion-électrons) sont comparablement satisfaisants, sauf pour la détection d'ions de masses élevées [Oberheide, 1997 ; Westmacott, 1996 ; Brunellea, 1993 ; Kaufmann, 1992]. En effet, au-delà de 50 000 Da,

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

l'efficacité des détecteurs décroît sensiblement. Hormis cette limitation particulière concernant essentiellement l'étude de macromolécules de masse moléculaire élevée, nous ne développerons pas davantage concernant le détecteur pour nous concentrer sur la source d'ionisation et l'analyseur.

1. Les sources

Il existe plusieurs sources d'ionisation d'une molécule :

- l'Ionisation Chimique (IC) ;
- l'Ionisation Electronique (IE) ;
- l'ionisation par bombardement d'atome rapide (ou *Fast-Atom Bombardement*, FAB) ;
- l'ionisation par électronébulisation (ou *Electrospray Ionization*, ESI) ;
- la désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI).

La méthode d'ionisation est choisie en fonction de quatre paramètres :

- la nature de l'échantillon (point d'ébullition, structure chimique...etc.) ;
- la méthode d'introduction de l'échantillon ;
- la fenêtre de masse de la molécule d'intérêt ;
- le niveau/type de fragmentation souhaité.

Lorsque l'échantillon est gazeux ou facilement volatilisable, l'IE et l'IC sont les deux méthodes indiquées. Elles s'adressent à des molécules ayant une masse moléculaire inférieure à 1000 Da. L'IC est une méthode plus douce que l'IE. Elle permet ainsi d'obtenir une majorité d'ions moléculaires et de limiter la production d'ions fragments. Il est intéressant de noter que ces derniers sont alors différents de ceux obtenus par IE. L'IC est donc indiquée pour la détermination de masses moléculaires. A l'inverse, l'IE aboutit à la

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

formation de nombreux fragments, ce qui en fait une technique très intéressante pour la détermination structurale de molécules.

L'ESI est une méthode encore plus douce que l'IC. En effet, contrairement à l'IC et à l'IE, l'ESI est une technique à pression atmosphérique et à température ambiante. L'ESI peut être utilisée avec des échantillons non volatiles, mais nébulisables : l'ESI aboutit à la pulvérisation de fines gouttelettes polychargées de l'échantillon. Cette méthode d'ionisation convient particulièrement aux macromolécules (jusqu'à 200 000 Da) comme certaines protéines, certains oligosaccharides ou encore comme le LPS. La production majoritaire d'ions moléculaires en fait une technique qui s'oriente vers la détermination de la masse moléculaire. Toutefois, il est à noter qu'une modulation des tensions électriques permet de faire varier le niveau de fragmentation de l'analyte.

De la même façon, la méthode FAB convient elle aussi particulièrement bien à la détermination de masses moléculaires élevées. Toutefois, elle s'adresse à des échantillons solides, qui ne peuvent être ni évaporés, ni nébulisés. Il en va de même pour l'ensemble des méthodes de désolvatation-ionisation, qui regroupe le MALDI et le FAB. Ces techniques sont douces et s'adressent à des composés de masse moléculaire d'au moins 1000 Da (jusqu'à 6000 Da pour le FAB et jusqu'à 500 000 Da pour le MALDI), qui ne peuvent être ionisés par ESI.

La méthode MALDI présente une étape délicate, la co-cristallisation de l'échantillon avec la matrice. Le choix de la matrice et l'homogénéité de la co-cristallisation sont deux des quelques points critiques, qui rendent cette étape délicate.

2. Les analyseurs

L'analyseur peut également être de plusieurs types :

- quadripolaire (Q) ;
- quadripolaire à trappe linéaire (ou *Linear Trap Quadrupole*, LTQ) ;
- à "orbitrap"TM ;
- à temps de vol (ou *Time Of Flight*, TOF) ;

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

- à transformée de Fourier et résonance cyclotronique (ou *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FT-ICR).

La performance d'un analyseur se détermine essentiellement sur la base de six paramètres (Tableau 4) :

- la gamme de masse ;
- la précision de détermination des masses ;
- la sensibilité ;
- le pouvoir de résolution ;
- la vitesse d'analyse ;
- son coût.

Type d'analyseur de masse	Limite supérieure de masse (m/z)	Précision des masses (ppm)	Sensibilité	Pouvoir de résolution	Vitesse d'analyse	Coût
Q	3000	>5	Non-disponible	+	+++	Le plus faible
LTQ	6000	>5	+++	++	++++	Faible
" <i>orbitrap</i> TM "	4000	1-3	++	++++	++	Le plus élevé
TOF	20 000	1-5	++++	+++	+++++	Modéré
FT-ICR	10 000	0,3-1	+	++++	+	Elevé

Tableau 4. Valeurs des paramètres de performance des différents types d'analyseur.

Adapté de Holcapek, 2009.

Selon une étude Web de Holcapek M. et coll. [Holcapek, 2009], basée sur un inventaire des papiers traitant de LC-MS, la répartition de l'utilisation des différents types d'analyseurs est largement en faveur des analyseurs LTQ et TOF, avec respectivement 35% et 26%. En effet, les analyseurs LTQ et TOF sont les plus répandus : les analyseurs TOF

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

permettent la détermination de masses moléculaires élevées avec une très bonne résolution. Toutefois, ils sont plus coûteux que les analyseurs LTQ dont les performances concurrencent celles des analyseurs TOF, tout en étant moins encombrants. Cette combinaison optimale explique leur succès.

Quant aux analyseurs "*orbitrap*TM" et FT-ICR, leur utilisation est limitée par un coût trop élevé.

3. Historique des analyses de LPS par spectrométrie de masse

Historiquement, les premières analyses de LPS par spectrométrie de masse ont eu lieu dans les années 1980. Elles ont mis en œuvre la méthode FAB [Hollingsworth, 1989].

Cette technique a laissé la place à l'utilisation de la désorption-ionisation laser assisté par matrice associée à un analyseur temps de vol (MALDI-TOF) et à l'ionisation par électroébulisaison associée à un analyseur quadripolaire à trappe d'ions (ESI-LTQ). La technique MALDI-TOF consiste à co-cristalliser sur un support métallique, un mélange de l'échantillon et d'une matrice. Le co-cristal est ensuite ionisé puis désorbé par un faisceau laser. Cette technique a l'avantage de permettre :

- une détermination structurale des LPS : longueur des chaînes O, nombres de répétitions des motifs osidiques les constituant [Aussel, 2000], état de phosphorylation des lipides A [Pupo, 2004] ;
- la proportion relative des différents chémotypes de LPS présent dans un échantillon [Eugenio Hardy] ;
- la masse moléculaire des LPS O-déacylés et celle de leurs oligosaccharides [Pupo, 2004].

La technique ESI, quant à elle, peut être couplée à un analyseur LTQ. Dans ce cas, elle peut être associée à une technique de séparation préalable. Par exemple, l'électrophorèse capillaire a déjà été utilisée avec succès dans ce cas [Thibault, 2000 ; Cox, 2002]. L'ESI-LTQ a également été couplée à des appareils de spectrométrie en tandem (MS/MS) pour déterminer la structure osidique de la chaîne polysaccharidique de certains LPS [Gulin, 2003]. Des spectromètres ESI avec un analyseur FT-ICR ont été mis en œuvre

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

dans l'étude de la structure de LPS provenant d'*E. coli* K12 [Muller-Loenniers, 2003] ou de LPS extrait de *Xanthomonas campestris* [Kacynski, 2007]. L'ESI a aussi été associée à des analyseurs à "orbitrapTM" pour l'analyse structurale de LPS. Notamment par Silipo A. et coll., qui ont utilisé un spectromètre en tandem, combinant une ionisation ESI avec deux analyseurs, l'un étant un "orbitrapTM" et l'autre un LTQ [Silipo, 2008]. Cet appareil leur a permis de déterminer la structure d'un lipide A de *Agrobacterium tumefaciens*.

Une séparation des ions en phase gazeuse à pression atmosphérique et indépendante du rapport masse/charge par FAIMS (*high-Field Asymmetric waveform ion Mobility Spectrometry*) a été utilisée suivie d'une électrophorèse capillaire et d'un système ESI-MS pour analyser des LPS après o-déacylation par l'hydrazine anhydre [Li, 2004]. L'étape préalable de séparation par FAIMS a permis de diminuer le bruit de fond et d'améliorer la limite de détection de la chaîne polysaccharidique.

V. Méthodes d'analyse structurale des complexes supramoléculaires de LPS

La formation de complexes supramoléculaires de LPS en solution aqueuse, dont l'activité biologique diffère de celle des monomères [Mueller, 2004] qui les composent, nécessite d'étudier les propriétés physico-chimiques de ces édifices pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Différentes techniques d'analyse structurale peuvent être utilisées pour caractériser les complexes supramoléculaires de LPS :

- D'une part, la diffusion dynamique de la lumière, la microscopie électronique à transmission et la microscopie à force atomique permettent de déterminer la CAC, ainsi que la taille (Figure 14) et l'architecture des complexes supramoléculaires de LPS.

- D'autre part, la zétamétrie et la technique de fluorescence à l'état stable de sondes pyrènes permettent de déterminer respectivement leur charge électrique de surface et leur hydrophobicité.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

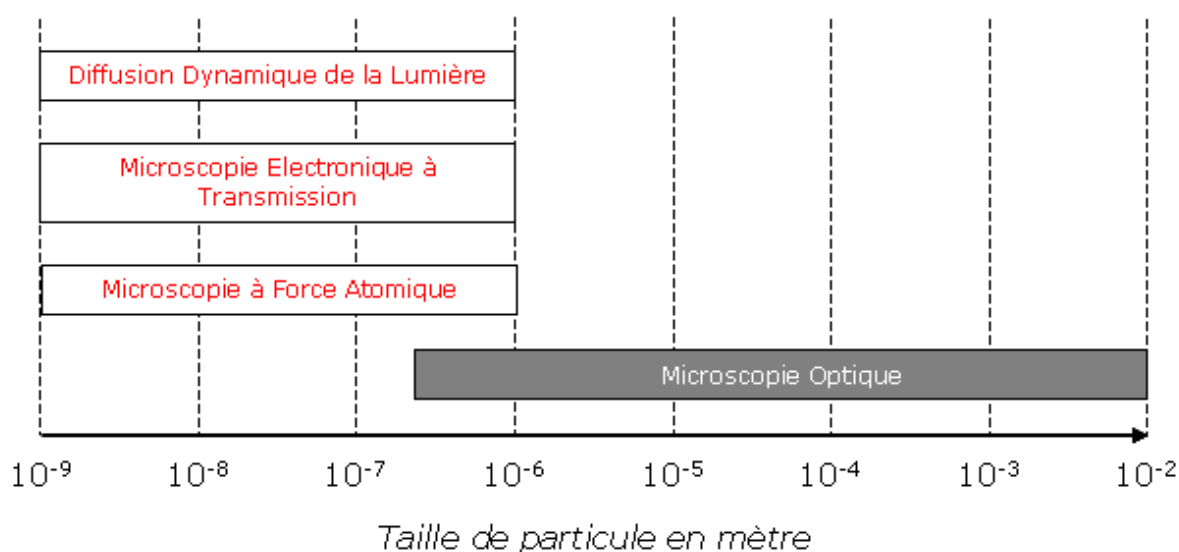


Figure 14. Domaine de résolution des techniques de détermination de taille des complexes supramoléculaires de LPS en comparaison à la Microscopie Optique.

1. Diffusion Dynamique de la Lumière

La diffusion dynamique de la lumière (ou *Dynamic Light Scattering*, DLS ; ou *Quasi-Elastic Scattering Light*, QESL ; ou *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) est une technique qui permet de déterminer la distribution des tailles de particules submicroniques en suspension dans un fluide translucide, notamment dans le cas où ces particules sont des complexes supramoléculaires de LPS [Santos, 2003 ; Bergstrand, 2006]. Elle permet aussi de déterminer la concentration de LPS à partir de laquelle le LPS va s'auto-assembler spontanément pour former des complexes supramoléculaires, autrement dit la CAC ou la CMC [Santos, 2003 ; Sasaki, 2008].

Comme son nom l'indique, la DLS se fonde sur l'analyse des fluctuations au cours du temps de la lumière diffusée par un échantillon traversé par un laser [Merkus, 2009]. La diffusion de la lumière est un phénomène optique consécutif à la propagation d'un faisceau laser incident dans un fluide translucide. Ce phénomène optique consiste en une diffusion du faisceau laser incident dans toutes les directions de l'espace. L'intensité et la fréquence de la lumière diffusée sont fonction de la taille des particules rencontrées dans le solvant par le faisceau laser incident. En effet, les molécules de solvant excitées par l'énergie thermique du milieu vont entrer en collision avec les particules. Ces impacts vont

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

entraîner le mouvement des particules, c'est ce que l'on nomme le mouvement brownien ou l'agitation thermique des particules. Le mouvement brownien modifie constamment la position desdites particules et engendre donc des fluctuations de la lumière diffusée.

La première étape de la technique consiste donc à mesurer sur un certains laps de temps, l'intensité et la fréquence de la lumière diffusée à un angle d'observation donné (θ) par un photomultiplicateur (Figure 15).

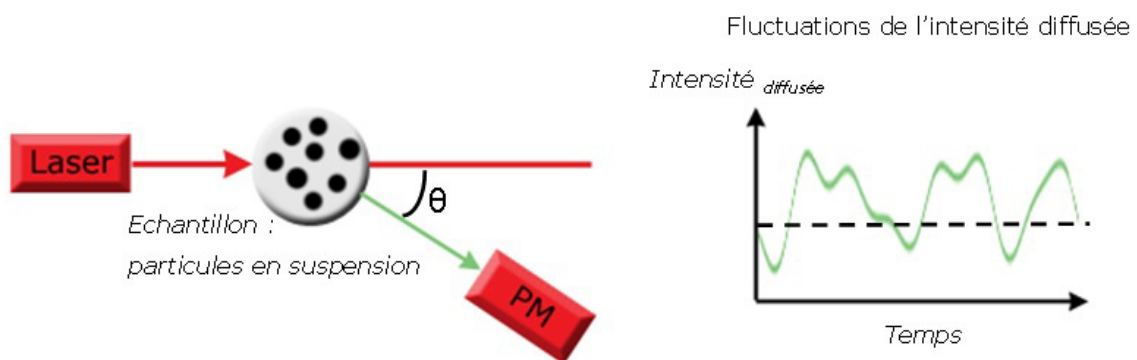


Figure 15. Représentation de la mesure des fluctuations de l'intensité diffusée par DLS.

L'analyse de ces fluctuations lumineuses par un corrélateur numérique permet d'établir la fonction d'autocorrélation $G_2(\theta)$ (Figure 16). Cette fonction qui traduit la probabilité de retrouver une particule à la même position spatiale à l'instant t et à l'instant $t+\theta$, permet de déterminer mathématiquement le temps de relaxation (t_c) (Figure 16). Or, à une viscosité donnée, plus une particule est petite, plus son agitation thermique est importante et donc plus cette probabilité est faible et plus le temps de relaxation est petit.

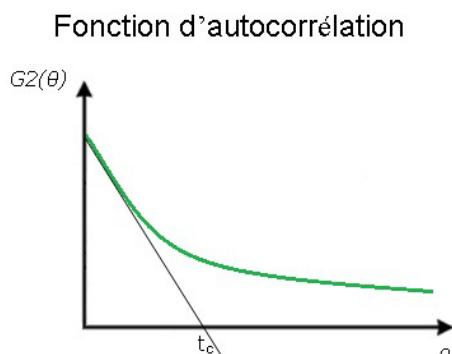


Figure 16. Détermination graphique du temps de relaxation t_c à partir de la fonction d'autocorrélation.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

A partir du temps de relaxation, le coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné est déterminé par le calcul selon la relation :

$$1/t_c = Dq^2$$

$$\text{Soit } D = 1/t_c q^2$$

Où t_c est le temps de relaxation ;

D le coefficient de diffusion ;

q le vecteur d'onde (ce qui correspond à l'inverse de la longueur d'onde).

Or, le rayon hydrodynamique (ou diamètre de Stokes) desdites particules est déterminé à partir du coefficient de diffusion des particules selon la relation de Stokes-Einstein :

$$D = k_B T / 6\pi\eta r$$

$$\text{Soit } r = k_B T / 6\pi\eta D$$

Où D est le coefficient de diffusion ;

k_B la constante de Boltzmann ;

T la température ;

η la viscosité du solvant ;

r le rayon hydrodynamique de la particule considérée.

La première limite de cette technique tient au biais d'estimation de la distribution des tailles de particules dans le cas où la population de particule est polydisperse (par opposition à monodisperse), autrement dit de tailles trop hétérogènes [Pine, 1990 ; Tomaszewska, 2013]. En effet, dans ce cas les plus grosses particules sont susceptibles de masquer les plus petites, la proportion de ces dernières étant alors sous-estimée.

La deuxième limite de cette technique est que tous mouvements parasitant le mouvement brownien des particules, comme cela peut-être le cas de la sédimentation des particules, biaise la corrélation entre le signal lumineux diffusé et la taille des particules.

La troisième limite de cette technique tient au fait que le rayon hydrodynamique mesuré est le rayon d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Or, cette modélisation de la particule comme une sphère, est certes nécessaire à la détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, mais peut s'avérer abusive, car toutes les particules ne sont pas de forme sphérique. Il est donc nécessaire de

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

vérifier la validité de cette hypothèse en déterminant la morphologie desdites particules par une technique directe.

Pour ce faire, la Microscopie Electronique à Transmission (MET) et la Microscopie à Force Atomique (MFA) sont deux techniques de référence pour l'observation directe de particules nanométriques.

2. Microscopie Electronique à Transmission

La Microscopie Electronique à Transmission (MET) permet de déterminer par observation directe la taille, la morphologie et l'architecture d'objet de tailles nano à micrométriques, mais non sans une préparation préalable de l'échantillon à étudier [Williams, 2009 ; Ruozi, 2011]. Ces objets peuvent être des assemblages de macromolécules comme c'est le cas des complexes supramoléculaires de LPS. [Ribi, 1966 ; Shands, 1967 ; Hurlbert, 1977 ; Nixdorff, 1978 ; Shands, 1980].

Le principe de la MET est basée sur la projection d'un faisceau d'électrons sur un échantillon très mince (Figure 17). Les électrons ainsi projetés traversent l'échantillon ou sont stoppés par une fine couche de métaux lourds recouvrant l'échantillon et opaque aux électrons. En effet, une étape de coloration négative des échantillons par un traitement aux sels de métaux lourds (acide phosphotungstique ou permanganate de potassium) est nécessaire à l'observation en MET. Le contraste obtenu par ce traitement de l'échantillon permet d'observer les objets d'intérêt qui apparaissent alors en nuances de gris sur un fond noir.

L'électron peut être décrit comme une onde électromagnétique dont la longueur d'onde est inférieure à celle de la lumière. Or, la limite de résolution en microscopie est définie par $d \approx \lambda/2$ où λ est la longueur d'onde du faisceau incident. Donc, la moindre longueur d'onde des électrons par rapport à la lumière permet d'améliorer remarquablement cette limite de résolution. En effet, alors qu'il est impossible de distinguer deux points séparés par moins de 200 nm en microscopie optique, l'utilisation d'un faisceau d'électrons abaisse cette limite de résolution à 0,1 nm. Théoriquement, la

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

résolution pourrait être meilleure, mais elle est limitée en pratique par l'efficacité des condensateurs ou lentilles électromagnétiques, dont le rôle est de former et d'orienter le faisceau incident d'électrons.

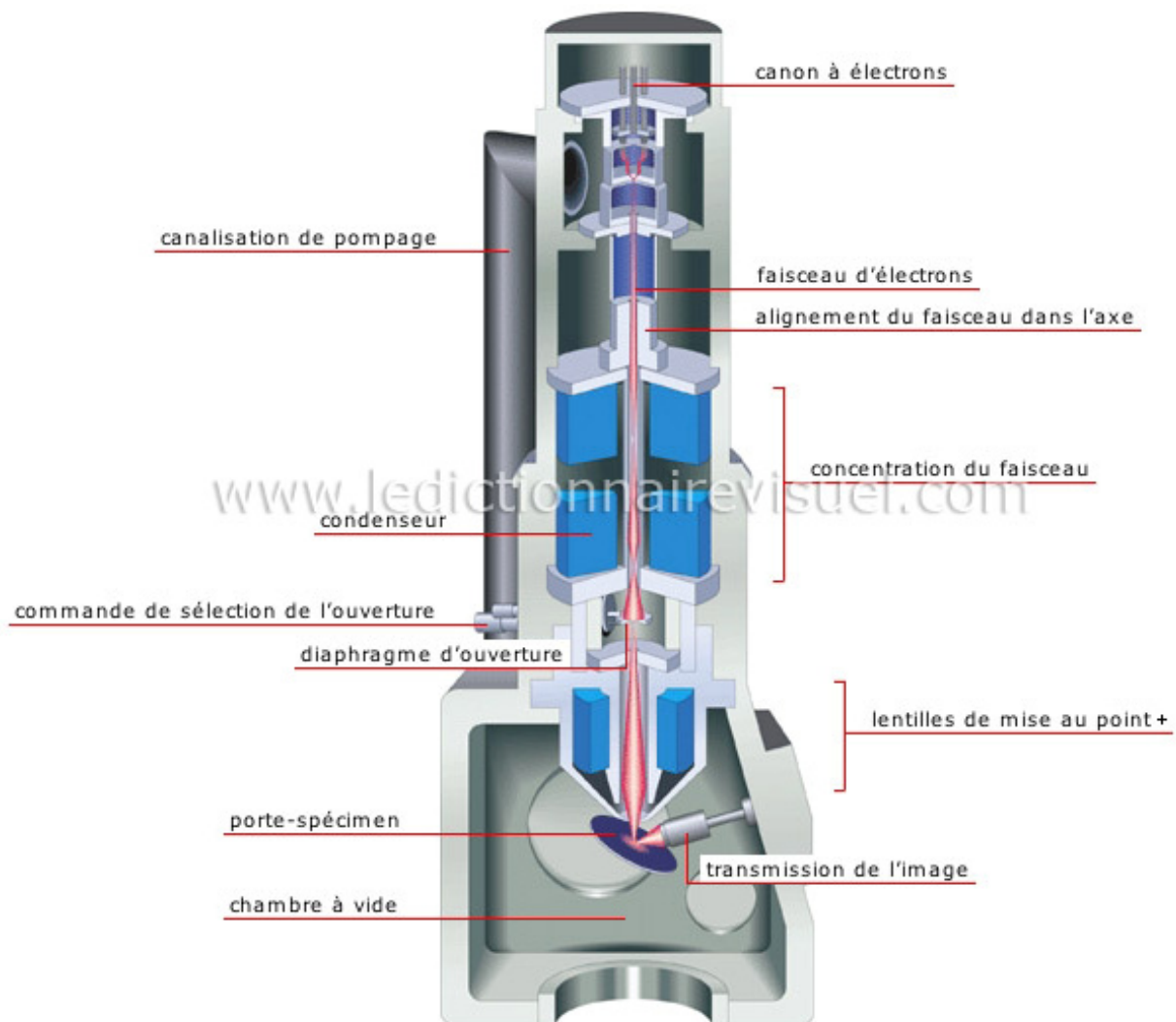


Figure 17. Représentation en coupe tridimensionnelle d'un microscope électronique à transmission. D'après *ledictionnairevisuel.com*.

Deux autres limites de cette technique consistent en la nécessité de préparer l'échantillon pour pouvoir l'observer [Ruozi, 2011] :

- La première de ces limites tient à la coloration négative de l'échantillon, qui est susceptible d'interagir et donc de modifier les structures d'intérêt ;

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

- La seconde de ces limites consiste en la nécessaire déshydratation de l'échantillon pour pouvoir l'observer. En effet, les électrons du faisceau incident ne devant rencontrer aucun obstacle avant d'interagir avec l'échantillon, il est nécessaire de placer ce dernier dans un vide poussé. Cet impératif technique empêche la présence de tout solvant à l'état liquide. L'observation d'échantillons hydratés exige donc une déshydratation préalable.

Cette méthode peut donc générer des artefacts dans l'observation des complexes supramoléculaires de LPS du fait de cette étape de déshydratation. En effet, l'agrégation des LPS a lieu en milieu aqueux. Si les complexes supramoléculaires de LPS ne sont pas suffisamment stables, on peut donc supposer que la déshydratation est susceptible de modifier leurs propriétés, notamment en termes de taille, de morphologie et d'architecture.

Il est donc nécessaire de confirmer les observations de complexes supramoléculaires de LPS faites en MET par une autre technique d'observation directe. La MFA ne nécessitant aucun traitement de l'échantillon préalable à son observation, elle peut permettre une consolidation des résultats obtenus en MET [Ruozi, 2011].

3. Microscopie à Force Atomique

La Microscopie à Force Atomique (MFA) permet de déterminer par observation directe la taille, la morphologie et l'architecture d'objet de tailles nano à micrométriques sans aucune préparation préalable de l'échantillon à étudier [Meyer, 1992 ; Ruozzi, 2011]. Ces objets peuvent être des bactéries [Strauss, 2009] ou des assemblages de macromolécules comme c'est le cas des liposomes [Ruozzi, 2005 ; Nakano, 2008] et des complexes supramoléculaires de LPS [Aurell, 1999].

Le principe de la MFA est basé sur le balayage de la surface d'un échantillon déposé sur une plate-forme en mica, par une pointe très fine placée au bout d'un levier de raideur k connue (Figure 18). Sur la partie supérieure réfléchissante de ce levier pointe un faisceau laser incident dont la réflexion est enregistrée par une photodiode.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

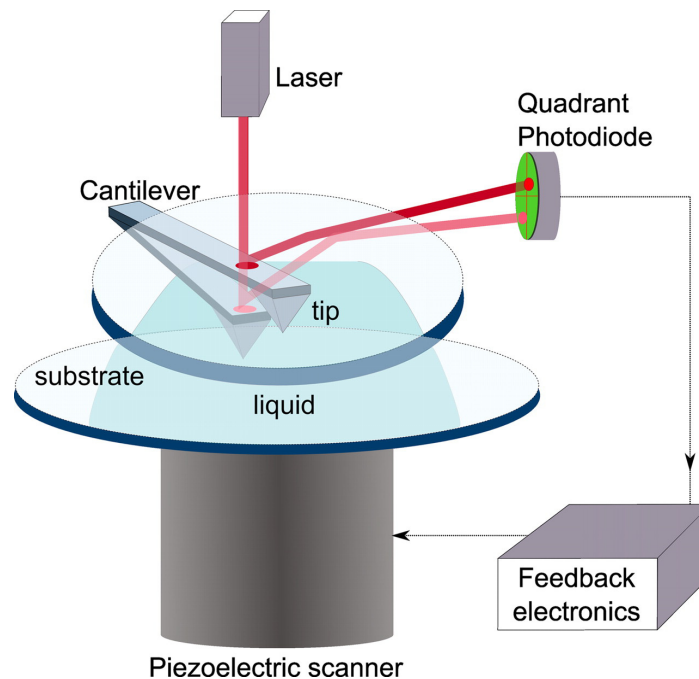


Figure 18. Représentation tridimensionnelle d'un microscope à force atomique.

D'après Baclayon, 2010.

Lors du balayage, la déflexion du levier Δz résultant de la force d'interaction F entre la pointe mobile et l'échantillon se traduit donc par des fluctuations du faisceau laser réfléchi enregistrées par la photodiode. Le traitement mathématique de cette mesure permet de déterminer la force d'interaction entre l'échantillon et la pointe grâce à la relation :

$$F = k\Delta z$$

Où F est la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon ;

k la constante de raideur du levier ;

Δz la déflexion du levier.

Finalement, l'association de chaque forces d'interaction avec la position spatiale (coordonnées x , y et z) correspondant au lieu de sa mesure, permet de générer informatiquement une "image de force" de l'échantillon étudié. L'obtention des "images de force" peut être réalisée selon deux modes d'analyse de l'échantillon :

- le mode "*contact*" : La pointe balaie la surface de l'échantillon à hauteur constante, tout en mesurant la déflexion du levier ;

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

- le mode "*tapping*" : Le levier est mis en oscillation contrôlée. Lors du balayage, la pointe entre donc en contact avec l'échantillon de façon intermittente.

En comparaison au mode "*contact*", le mode "*tapping*" réduit le risque de dégradation de l'échantillon étudié. Les fluctuations des oscillations de la pointe provoquées par son interaction avec la surface de l'échantillon, sont enregistrées et traitées pour obtenir une "image de force" de l'échantillon.

Les trois principales limites de cette technique consistent en [Ruozi, 2011] :

- l'épaisseur de la pointe, qui définit la résolution de l'image dans les directions spatiales x et y . Certaines pointes faites de nanotubes de carbone ont des épaisseurs de l'ordre de l'atome ;
- la précision du cristal piézo-électrique, qui déplace la platine porte échantillon et donc définit la résolution de l'image dans la direction spatiale z ;
- la possibilité d'une déformation des objets trop fragiles par la pointe en mouvement. Une utilisation conjointe de la technique de MAF et de MET est donc recommandée pour consolider les résultats d'observation lors de l'étude de la taille, de la morphologie et de l'architecture des complexes supramoléculaires de LPS. En effet, la MET étant limitée par des facteurs différents de ceux qui limitent la MFA, l'utilisation de ces deux techniques est complémentaire.

4. Zétamétrie

Le potentiel zêta (ζ) est la charge électrique de surface d'une particule en suspension [Everett, 1988]. Cette charge électrique de surface est le résultat de la formation d'un environnement ionique particulier autour de la particule en suspension dans un solvant. A l'équilibre, cet environnement consiste en une double couche ionique (Figure 19) :

- La couche interne (couche de Stern) est composée d'ions de charges opposées à celles de la surface de la particule. Ces ions sont fortement liés à la particule ;

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

- La couche diffuse (couche de Gouy-Chapman) est composée d'ions de charges opposées à celles des ions de la couche interne, donc de même charge que la surface de la particule. Elle contient également une minorité de charges identiques à celles de la couche interne.

La couche diffuse est elle-même divisée en deux parties par une interface virtuelle, appelée le plan glissant (Figure 19) :

- la partie proximale de la couche diffuse est fortement liée à la particule, cette partie forme une entité stable, qui se déplace d'un bloc sous l'effet de l'agitation thermique, de flux hydrodynamiques ou de champs électriques ;
- la partie distale de la couche diffuse est faiblement liée à la particule, de sorte qu'elle ne suit pas les mouvements de la particule.

Le potentiel au niveau du plan glissant est le potentiel zêta. Le potentiel zêta est donc la charge de surface de l'ensemble "particule-couche interne- partie proximale de la couche diffuse".

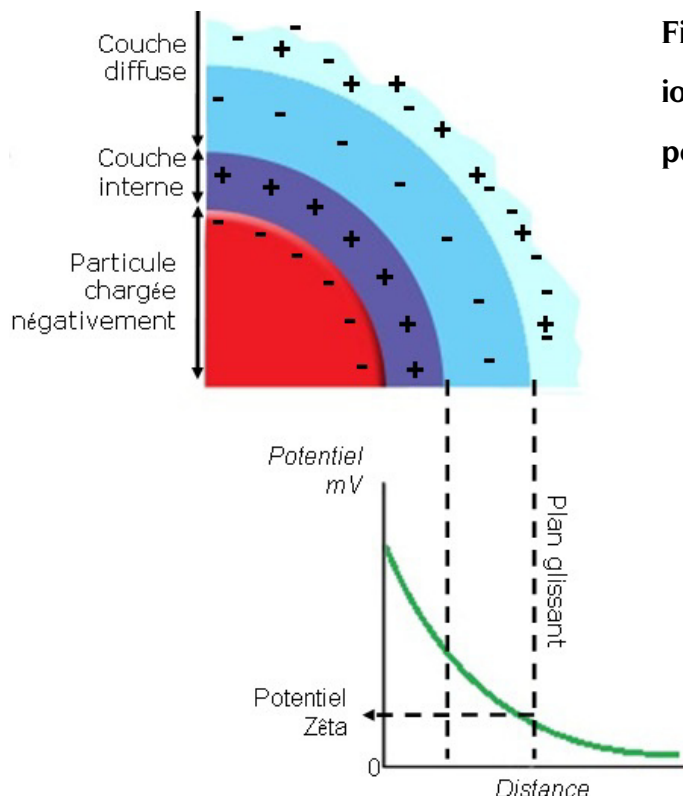


Figure 19. Représentation des couches ioniques entourant une particule et du potentiel zêta.

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

Le potentiel zêta de particules chargées en suspension dans un fluide, comme les complexes supramoléculaires de LPS en solution, est déterminé par zétamétrie [Lyklema, 1991 ; Hardy, 2012] de la façon suivante :

Sous l'action d'un courant électrique traversant une cuve en forme de U, les particules chargées en suspension se déplacent vers l'électrode de charge opposée. La vitesse de déplacement de la particule est alors mesurée par effet Doppler. Cet effet est exploité grâce au croisement de deux faisceaux lasers monochromatiques, qui produisent à leur intersection un motif d'interférence composé d'une succession de hachures sombres et brillantes. Le pas entre les hachures ou interfrange peut-être calculé selon la relation :

$$\Delta S = \lambda / 2 \sin \varphi$$

Où ΔS est l'interfrange du motif d'interférence ;

λ la longueur d'onde des faisceaux lasers monochromatiques ;

φ l'angle des faisceaux lasers par rapport à la normale.

Lorsque sous l'effet du courant électrique la particule parcourt le plan du motif d'interférence, la lumière émise par cette particule varie en intensité selon qu'elle se trouve sur une hachure sombre ou une hachure brillante. La fréquence de cette fluctuation d'intensité lumineuse est la fréquence Doppler. On obtient alors la vitesse de déplacement de la particule à partir de la relation :

$$v_p = f_D \cdot \Delta S$$

Où v_p est la vitesse de déplacement de la particule ;

f_D la fréquence Doppler ;

ΔS l'interfrange du motif d'interférence.

Or, la vitesse de déplacement v_p dépend du potentiel zêta des particules, de l'intensité du courant électrique, de la constante diélectrique du solvant et de sa viscosité selon la relation tirée de l'équation de Hückel :

$$\zeta = \eta \cdot v_p / E \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r$$

Où ζ est le potentiel zêta ;

η la viscosité du solvant ;

v_p la vitesse de déplacement de la particule ;

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

E le champ électrique ;

ϵ_0 la constante diélectrique du vide ;

ϵ_r la constante diélectrique du solvant.

A partir de la mesure de la vitesse de déplacement de ces particules sous l'effet d'un courant électrique, le calculateur du zétamètre détermine donc leur potentiel zêta.

La valeur absolue du potentiel zêta doit être suffisante pour assurer la stabilité du système colloïdal [Everett, 1988]. En effet, si la valeur absolue du potentiel zêta est suffisante, les particules se repoussent évitant l'agrégation; alors que les particules dotées d'une faible valeur absolue de potentiel zêta s'agrègent (Figure 20). Il est admis que les systèmes colloïdaux présentant un potentiel zêta supérieur à +30 mV ou inférieur à -30 mV sont stables ; alors qu'en dessous d'une valeur absolue de 20 mV, ils sont instables [Everett, 1988 ; Lyklema, 1991]. Le potentiel zêta est donc un des facteurs qui concourent à la stabilité de ces systèmes en contre-carrant les forces d'attraction de Van der Waals.

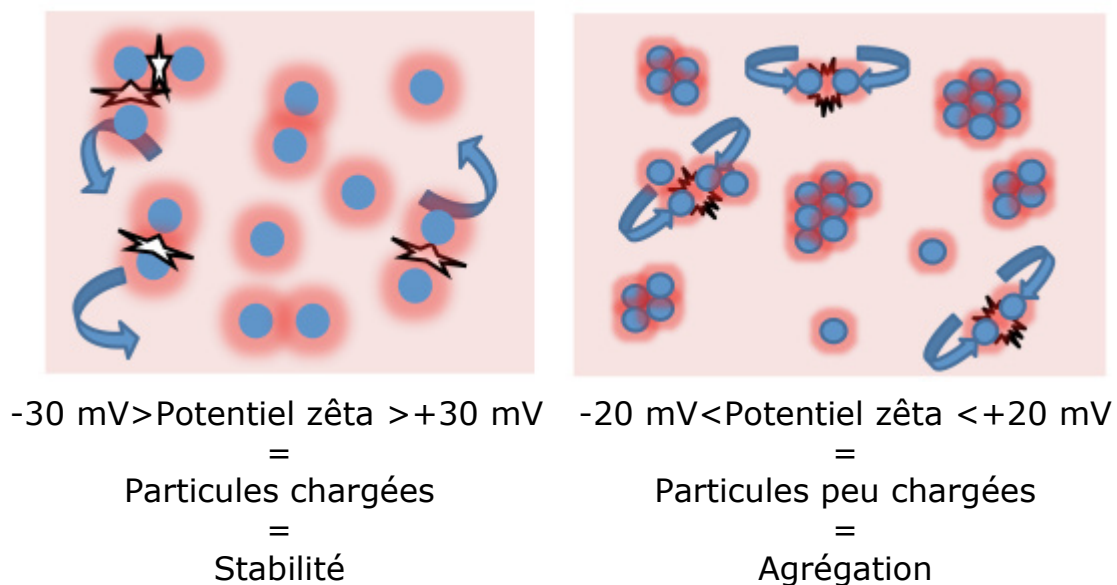


Figure 20. Représentation de la répulsion électrostatique entre particules en fonction du potentiel zêta. *Adapté de fors-instruments.fr.*

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

Toutefois, la limite de cette technique relève de la non-prise en compte de la répulsion stérique. Or, la répulsion stérique est un autre aspect à considérer dans la stabilité des systèmes colloïdaux. Dans le cas des complexes supramoléculaires de LPS, la répulsion stérique entre les complexes de LPS et occasionnée par leurs chaînes polysaccharidiques.

Globalement, les complexes supramoléculaires de LPS sont donc d'autant plus stables que leur potentiel zêta est élevé et que la répulsion stérique occasionnée par les chaînes polysaccharidiques de LPS est importante. La chaîne polysaccharidique étant la portion hydrophile de la molécule de LPS, son importance relative par rapport au lipide A, qui constitue la portion hydrophobe du LPS, peut être caractérisée par le ratio d'hydrophobicité donné par la technique de la fluorescence à l'état stable de sondes pyrène.

5. Fluorescence à l'état stable de sondes pyrènes

Le pyrène est un composé hydrogénocarboné quadricyclique hydrophile (Figure 21) dont certaines fluctuations du spectre de fluorescence sont déterminées par l'hydrophobicité de son microenvironnement [Kalyanasundaram, 1976].

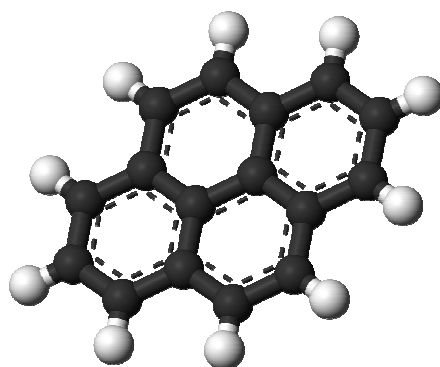


Figure 21. Représentation tridimensionnelle de la molécule de pyrène.

L'hydrophobicité des complexes moléculaires de LPS peut donc être déterminée par la méthode du ratio de l'intensité des pics I/III du spectre d'émission de fluorescence du pyrène [Ananthapadmanabhan, 1985 ; Aurell, 1998 ; Aguiar, 2003 ; Bergstrand, 2006].

Pour ce faire, le milieu aqueux utilisé comme phase dispersive pour la formation des complexes supramoléculaires de LPS doit être saturé en molécules de pyrène. Ainsi les

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

molécules de pyrène s'insèrent, jusqu'à l'équilibre, entre les molécules de LPS composant les complexes supramoléculaires selon la loi d'action de masse. L'équilibre étant obtenu à concentration saturante de pyrène, il est reproductible. Sous l'effet d'une excitation lumineuse à 335 nm, le pyrène émet alors de la lumière dont le spectre présente deux pics remarquables à des longueurs d'onde respectives de 374nm et 384nm. En effet, l'intensité du pic à 384 nm (III) est suffisamment stable pour être utilisée comme référence [Kalyanasundaram, 1976 ; Figure 22], alors que celle du pic à 374 nm (I) est d'autant plus faible que l'environnement du pyrène est hydrophobe [Nakajima, 1974 ; Nakajima, 1976 ; Figure 22]. Le ratio I/III reflète donc l'hydrophobicité des complexes supramoléculaires de LPS. Plus le ratio I/III est petit, plus les complexes supramoléculaires de LPS sont hydrophobes. Plus le ratio I/III est grand, moins les complexes supramoléculaires de LPS sont hydrophobes.

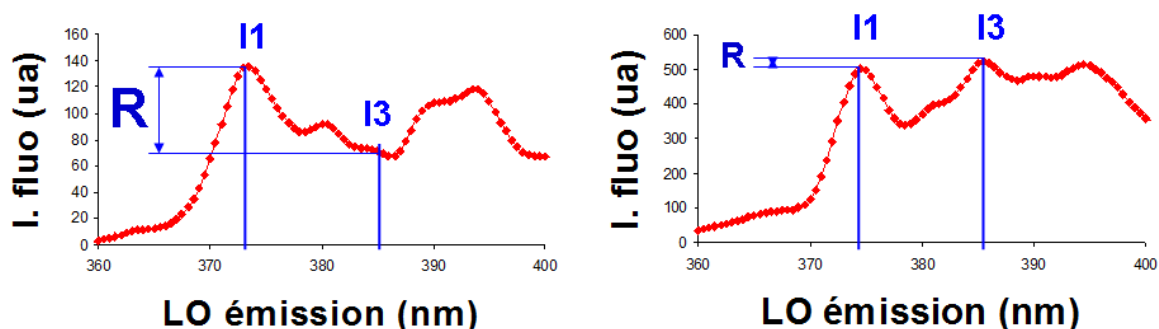


Figure 22. Spectre d'émission de fluorescence du pyrène sous l'effet d'une excitation à 335nm. *A gauche : microenvironnement du pyrène faiblement hydrophobe. A droite : microenvironnement du pyrène fortement hydrophobe.*

L'hydrophobicité est un des aspects physico-chimiques des complexes supramoléculaires de LPS. Il est donc au même titre que la CAC et le potentiel zêta, un facteur intervenant dans la stabilité des complexes supramoléculaires de LPS en milieu aqueux.

En conclusion, les méthodes d'analyse structurale des complexes supramoléculaires de LPS sont complémentaires entre elles :

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

- soit parce qu'elles explorent des caractéristiques physico-chimiques différentes, comme c'est le cas de la zétamétrie (potentiel zêta), de la fluorescence à l'état stable de sondes pyrène (hydrophobicité), de la DLS (CAC et distribution de la taille des complexes) et des techniques de microscopie (détermination individuelle de la taille des complexes).
- soit parce qu'elles mesurent le même paramètre, mais selon des différentes approches dont les forces et les faiblesses se compensent pour aboutir à des résultats consolidés. C'est le cas de la DLS (force/faiblesse : approche statistique/indirect), de la MET (force/faiblesse : approche direct/non-statistique et avec traitement physico-chimique de l'échantillon) et de la MFA (force/faiblesse : approche direct et sans traitement de l'échantillon /non-statistique).

VI. Méthode de mesure de l'activité biologique des LPS : test LAL versus stimulation macrophagique par les LPS

Historiquement, le LPS a été avant tout considéré comme une substance pyrogène. En biologie, la pyrogénicité, terme issu du grec ancien "*pyro*" signifiant "chaleur, feu" et "*genesis*" signifiant "création", est la capacité d'induire de la fièvre. Le premier test ayant tenté d'évaluer l'effet des LPS se base sur cette pyrogénicité. Il s'agit du test de pyrogénicité chez le lapin [Sharma, 1986] [EP, 2007], qui se fonde sur la capacité de certaines substances à induire une augmentation de la température corporelle chez le lapin en réponse à leur injection intraveineuse [Nakagawa, 2002].

L'utilisation du test LAL pour remplacer ce premier test historique a été motivée par des raisons de coût, de praticité et d'éthique [Park, 2005].

1. Test LAL

En 1885, Howell décrit les phénomènes de coagulation intravasculaire chez un arthropode marin, la limule (*Limulus polyphemus* ou *Xyphosura polyphemus*), infecté par des bactéries à Gram négatif [Howell, 1885]. Ce processus est le résultat de l'activation de la coagulase, une enzyme de coagulation présente dans le lysat des amœbocytes de

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

l'hémolymph de limule. Le principe du test LAL se base sur le déclenchement d'une cascade enzymatique par le LPS, aboutissant à l'activation de la coagulase [Levin, 1964 ; Figure 23] : le LPS active le facteur C, qui va alors activer le facteur B, ce dernier ainsi activé va permettre l'activation de la procoagulase en coagulase.

En fonction du type de test LAL, la suite du processus va différer :

- dans le test LAL par turbidimétrie, la coagulase va cliver la protéine coagulogène en coaguline. C'est le trouble qui accompagne cette réaction qui est mesuré pour quantifier l'activité biologique du LPS ;
- dans le test LAL par gélification, c'est la gélification par agrégation de la coaguline qui permet de détecter la présence du LPS ;
- dans le test LAL chromogénique, le coagulogène est remplacé par un substrat chromogène spécifique de la coagulase. Cette dernière est en effet capable de scinder ce substrat en deux produits dont l'un est une molécule colorée, la paranitroaniline. C'est la mesure de cette coloration qui permet la quantification de l'activité biologique du LPS.

Le test LAL est particulièrement sensible à une très large palette d'interférents (Figure 23) :

- le pH ;
- les cations divalents ;
- les agents chélateurs, comme l'EDTA et l'héparine ;
- le sang, le sérum, le plasma et les protéines sériques (LBP, le cluster de différenciation 14 (CD14)...etc.) ;
- les lipides et les liposomes ;
- les matériaux plastiques dont sont faits certains tubes à essai [Roslansky, 1991].

Les interférences sont particulièrement problématiques dans le cadre de l'analyse du sang total : les LPS y sont associés à des cellules, à des protéines sériques, à des lipoprotéines. Les pré-traitements des échantillons sanguins pour dissocier le LPS de ces

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

interférents existent, mais ils ne sont pas suffisamment efficaces [Tamura, 1991 ; Roth, 1990].

Globalement, lorsque les LPS sont présents dans l'échantillon à une concentration suffisante, la dilution reste encore la solution la plus efficace pour s'affranchir des interférences, tout en conservant une bonne détectabilité [Roth RI 1990]. Toutefois, malgré la dilution des échantillons, la quantification absolue de l'activité biologique reste délicate en présence de faible quantité de LPS.

Enfin, le test LAL présente un manque de spécificité pour les LPS dans la mesure où un polysaccharide produit par les moisissures, le glucane- β -1,3 est capable d'activer la procoagulase par l'action intermédiaire non plus du facteur C, mais du facteur G [Brandenburg, 2009 ; Figure 23]. Cette activation de la procoagulase aboutit donc à une réponse positive du test LAL en l'absence de LPS (faux positif).

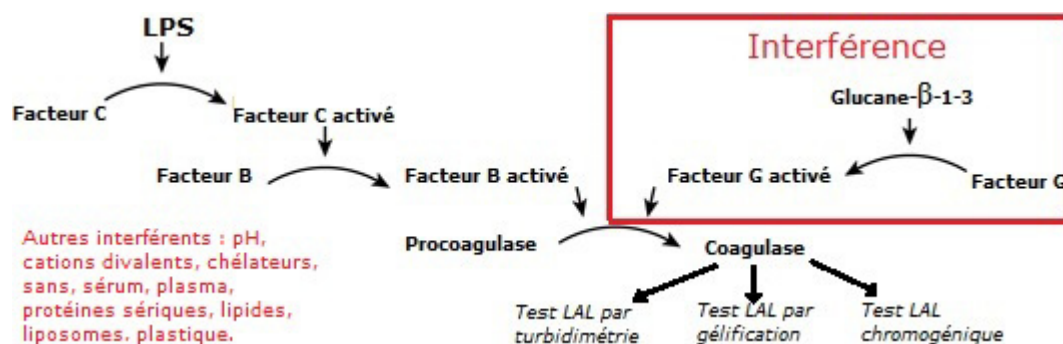


Figure 23. Schéma représentant le principe du test LAL et ses interférents.

2. Stimulation macrophagique par les LPS

Bien que considéré comme le remplaçant du test de pyrogénicité chez le lapin, le test LAL n'est pas un test de pyrogénicité à proprement parlé. En effet, un test de pyrogénicité du LPS doit être capable d'évaluer soit l'induction de la fièvre, soit le niveau de production des substances endogènes induisant la fièvre, essentiellement les cytokines pyrogènes IL-1 β [Dinarello, 1974 et 1991], IL-6 et TNF- α [Dinarello, 1986 et 1991]. En fait, le test LAL est plutôt un test de détection du LPS, manquant d'ailleurs de spécificité [Brandenburg, 2009].

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

Incapable de déterminer la pyrogénicité des LPS, le test LAL est plutôt un test de l'activité biologique des LPS. L'activité biologique des LPS est leur capacité à induire des effets biologiques en réponse à leur interaction avec un organisme vivant. Le test LAL se fondant sur le mécanisme de réponse biologique de la limule aux LPS, il est une façon de traduire leur activité biologique.

Toutefois, chez les vertébrés, ce sont les cytokines pro-inflammatoires et/ou anti-inflammatoires, induites par la présence des LPS dans l'organisme hôte, qui traduisent l'activité biologique de ces derniers. C'est pourquoi, le test de stimulation macrophagique par les LPS constitue un outil de référence pour caractériser l'activité biologique des LPS chez les vertébrés.

Le test de stimulation macrophagique par les LPS consiste à cultiver des macrophages en présence d'échantillons contenant les LPS dont on veut mesurer l'activité biologique. Après environ 5 heures d'incubation, les surnageants de culture sont recueillis pour déterminer par cytométrie en flux les quantités des différentes cytokines sécrétées dans le milieu de culture par les macrophages.

Outre la mesure de la quantité de cytokines, cette approche a le mérite de fournir une information approfondie sur l'activité biologique du LPS, car elle apporte un aspect qualitatif par la détermination d'une composition relative en cytokines dans le milieu, avec des proportions de cytokines pro-et anti-inflammatoires pouvant varier suivant les types de LPS présents.

La nécessité de travailler avec des échantillons contenant une concentration de LPS inférieure au seuil de toxicité pour les macrophages, ainsi que la complexité d'interprétation de la balance cytokinique entre tendances pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, constituent les contraintes de la technique de stimulation macrophagique par les LPS ; tandis que le test LAL avec son unique variable (l'activation de la coagulase), est beaucoup plus simple d'interprétation. Pourtant, cette simplicité représente aussi sa limite, car elle donne une expression restreinte de l'activité biologique des LPS et somme toute faite arbitraire, car concernant essentiellement la limule. Ceci dit, cette simplicité du test LAL combinée au dosage de l'acide 3-hydroxymyristique, permet de calculer un ratio

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

d'inactivation des LPS qui caractérise le pouvoir d'inactivation des LPS de l'organisme hôte et confère donc toute sa légitimité au test LAL [*cf.* article n°1].

Pour résumé, ces deux techniques sont complémentaires, car optimales dans des indications différentes :

- évaluation de l'activité biologique des LPS pour la technique de stimulation macrophagique par les LPS ;
- évaluation du pouvoir d'inactivation des LPS de l'organisme hôte pour le test LAL dans son utilisation combinée avec le dosage de l'acide 3-hydroxymyristique.

VII. Méthodes de dosage des molécules de LPS

1. Dosage de l'acide 3-hydroxymyristique (C14-3OH)

Une grande majorité des LPS possèdent des lipides A dont l'acide C14-3OH est une des chaînes acyles constitutives. Cet acide gras est spécifique des bactéries et n'est trouvé qu'à l'état de traces chez les vertébrés. Du fait de cette spécificité, il constitue un marqueur de choix pour quantifier les LPS au sein des tissus de vertébrés. La libération de l'acide C14-3OH, son extraction, sa méthylation et sa purification par chromatographie en phase gazeuse permettent ensuite sa quantification par spectrométrie de masse [Kirschner, 1985 ; Maitra, 1986]. La chromatographie liquide à haute performance a déjà été utilisée comme une alternative [Morris, 1990]. Tanamoto K. et coll. ont également développé un marquage fluorescent de l'acide C14-3OH, qui permet sa quantification par spectrofluorimétrie [Tanamoto, 1990]. Plus récemment, nous avons développé une technique de dosage de l'acide C14-3OH, plus efficace, que les précédentes. Celle-ci consiste à le libérer, l'extraire, le purifier et le quantifier par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS ; *cf.* article n°1).

Ces types de dosages ont l'avantage d'être peu sensibles aux contaminants du milieu. Toutefois, pour faire la corrélation entre la concentration molaire d'acide C14-3OH mesurée et celle de LPS dans l'échantillon de départ, ces dosages nécessitent de connaître

Etude bibliographique

B. Méthodes physico-chimiques d'étude des LPS

la stœchiométrie de l'acide C14-3OH dans les LPS analysés. En outre, le passage de la concentration molaire à la concentration massique de LPS nécessite de connaître la masse moléculaire des LPS en question.

2. Dosage de l'acide 3-desoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo)

Le Kdo est présent dans la grande majorité des molécules de LPS. Ce sucre est spécifique des bactéries. Du fait de cette forte spécificité, ce sucre est donc un bon marqueur pour quantifier les molécules de LPS dans un échantillon. Il existe plusieurs méthodes chimiques de dosage du Kdo:

- méthode à la diphenylamine [Chaby, 1974] ;
- méthode à la semi-carbazide [MacGee, 1954] ;
- méthode au périodate/thiobarbiturate [Weissbach, 1959].

Globalement, ces techniques consistent en un dosage colorimétrique du Kdo. Leur inconvénient provient de la possibilité d'interférence du maximum d'absorbance du Kdo (550 nm) avec celui d'autres constituants du LPS. En outre, le Kdo n'absorbe pas de la même façon en fonction de son insertion dans la molécule de LPS.

3. Dosage basé sur le shift de l'absorbance d'un colorant

Cette méthode de dosage est basée sur le déplacement du maximum d'absorption d'un colorant, qui est soit la carbocyanine [Kay, 1964], soit la 1,9-diméthyleméthylène [Keller, 1986] : en effet, ces colorants cationiques interagissent avec la région lipide A des LPS pour former des agrégats dont les maximums d'absorption sont différents de ceux du colorant.

La limite de cette technique consiste en la faible spécificité des colorants cationiques, qui sont susceptibles de se fixer à toute molécule chargée négativement (lipides, protéines, sucres ou acides nucléiques).

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

C. ENDOTOXEMIE

L'endotoxémie, caractérisée par l'accumulation de LPS dans le sang, est utilisée en routine depuis plus d'un siècle comme un modèle d'étude de l'inflammation ; notamment pour étudier la composante inflammatoire de certaines pathologies comme le SIRS. En effet, l'internalisation de LPS dans un organisme permet de mimer les effets physiopathologiques observés dans le cadre du SIRS : fièvre, diarrhée, hypotension, coagulation intravasculaire.

I. Endotoxémie : signalisations cellulaires et effets physiopathologiques

L'endotoxémie est caractérisée par l'entrée de LPS dans l'organisme, résultant naturellement d'une intrusion de bactéries à Gram-négatif. Les conséquences physiopathologiques de cette intrusion résultent d'une cascade d'effets en réponse à quatre types d'évènements :

- une action directe du LPS sur le système du complément : l'activation de C3 et C5 induit la production, de manière concomitante à celle de C3b et C5b comme décrit plus haut, de C3a et C5a [Zhang, 2007 ; Crane, 2007]. Ces deux fragments, appelés anaphylatoxines, favorisent entre autres le chimiotactisme des phagocytes et la libération de facteurs inflammatoires tels que l'histamine et la sérotonine par les mastocytes et les basophiles [Zhang, 2007] ;
- une action directe du LPS sur le système de coagulation : les LPS ont en effet la possibilité d'activer directement le facteur de Hageman (facteur XII dans la cascade de coagulation). Après conversion, le facteur XIIa induit la formation de kallikréine qui active d'une part la voie alterne du système du complément [Discipio, 1982] et renforce donc l'effet pro-inflammatoire de celui-ci, et d'autre part la formation de bradykinine, inducteur de l'inflammation par l'intermédiaire des mastocytes et des basophiles. De plus, le facteur XIIa induit la production d'une cytokine pro-inflammatoire par les monocytes, l'IL-1 [Toossi, 1992] ;

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

- une action directe du LPS sur les cellules endothéliales, qui disposent tout comme les monocytes, du système de signalisation via TLR4/MD2. La stimulation des cellules endothéliales conduit à la production de monoxyde d'azote (NO), puissant inducteur de vasodilatation et facteur de stress oxydant, mais également d'IL-6 [Dauphinee, 2006] et de PRolylCarboxyPepidase (PRCP), activateur de la kallikréine [Ngo, 2009] ;
- une action directe du LPS sur les monocytes via les récepteurs TLR4/MD2. Cette reconnaissance va déclencher une cascade de signalisation intracellulaire activant le facteur de transcription NF- κ B, et aboutissant à la sécrétion de cytokines inflammatoires [Guha M, 2001]. Cette voie sera abordée de manière plus détaillée dans la suite de ce chapitre.

1. Prise en charge des LPS circulants et transport à la surface des cellules

Deux protéines jouent un rôle-clé dans les étapes précoces de prise en charge des LPS : la LBP et le cluster de différenciation 14 (CD14). La LBP est une protéine plasmatique d'environ 60 kDalton (kDa) dont la synthèse a lieu dans les hépatocytes [Tobias, 1986 ; Tobias, 1989]. Lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire sa concentration plasmatique augmente, pouvant atteindre 40 mg/L, alors qu'elle est présente à une concentration d'environ 6 mg/L dans un contexte physiologique normal [Myc, 1997]. Cette protéine fait partie de la famille LT/LBP (*Lipid Transfer / LipoPolySaccharide Binding Protein*). Elle joue un rôle majeur dans la liaison aux LPS [Schumann, 1990], en interagissant avec la partie lipide A via son extrémité N-terminale. D'autre part, la LBP a la capacité de se lier à CD14 via son extrémité C-terminale.

CD14 est une glycoprotéine qui existe sous trois formes :

- une forme membranaire (mCD14) de 55 kDa présente uniquement à la surface des leucocytes polynucléaires (ou *PolyMorphoNuclear leukocyte*, PMN), des monocytes, des macrophages [Haziot, 1988 ; Simmons, 1989] et des lymphocytes B humains [Ziegler-Heitbrock, 1994] ;

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

- une forme soluble (sCD14), produit de clivage de 48 kDa, de la forme membranaire mCD14 [Labeta, 1993] ;
- une seconde forme soluble (sCD14) de 56 kDa excrétée par les hépatocytes avant l'addition d'une région glycosylphosphatidylinositol (ancrage GPI), qui permet l'ancrage membranaire de mCD14 [Labeta 1993].

Selon que la LBP et le CD14 sont impliqués ou pas, il existe trois voies de transfert des LPS à la membrane cellulaire.

a. Voie dépendante de LBP/CD14

La LBP est capable de potentialiser la réponse cellulaire au LPS en améliorant l'interaction de ce dernier avec le CD14 par la formation d'un complexe hétérotrimérique stable, LPS-sLBP-CD14 [Thomas, 2002] selon la séquence suivante :

- déstabilisation des complexes supramoléculaires de LPS par la sLBP ;
- association du LPS à la sLBP ;
- fixation du complexe hétérodimérique LPS-LBP au CD14 [Wright, 1990 ; Han, 1994].

Cette voie permet une activation optimale des récepteurs à la surface des leucocytes (Figure 24, à gauche).

b. Voie indépendante de LBP/CD14

Il a été démontré *in vivo*, que les LPS pouvaient induire une réponse pro-inflammatoire indépendamment de la LBP [Wurfel, 1997]. Les complexes supramoléculaires de LPS ont la possibilité d'être déstabilisés indépendamment de la sLBP, par la présence d'ions cationiques divalents ou par des facteurs protéiques de l'immunité innée. Les LPS monomériques se lient alors à l'albumine. Cette dernière joue alors un rôle

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

semblable à celui de CD14 en transférant les monomères de LPS aux protéines de signalisation (Figure 24, à droite). Cette voie reste néanmoins minoritaire en présence de LBP.

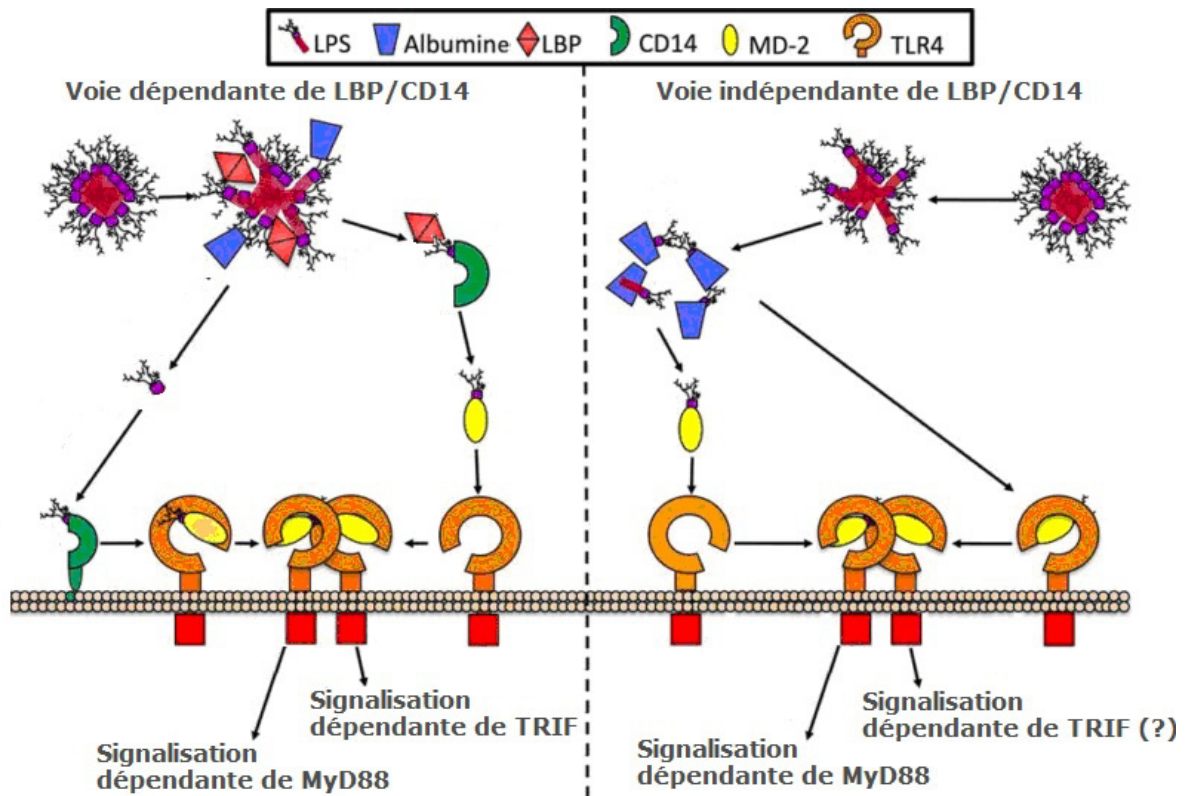


Figure 24. Schéma du mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon deux voies différentes.

A gauche. Mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon une voie dépendante de LBP et CD14.

A droite. Mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon une voie indépendante de la LBP et CD14, mais dépendante de l'albumine. D'après Gioannini, 2007.

c. Voie dépendante de LBP et indépendante de CD14

Toutefois, il a aussi été montré qu'indépendamment de CD14, la LBP peut jouer deux autres rôles antagonistes entre eux, en fonction de sa concentration plasmatique qui

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

influence sa localisation. En effet, la LBP peut être sous forme circulante à forte concentration ou sous forme transmembranaire à faible concentration [Gutsmann, 2001].

Si la fixation de la LBP à la membrane des PMN est préalable à la formation du complexe LPS-LBP [Figure 25.A.], alors la LBP peut avoir un rôle activateur de la réponse inflammatoire indépendamment de CD14 [Gutsmann, 2001]. Ainsi, à faible concentration, la mLBP peut lier les LPS circulants pour que ces derniers induisent une réponse cellulaire selon cette voie.

Dans le cas contraire [Figure 25.B.], une formation du complexe LPS-LBP avant la fixation de la LBP à la membrane des PMN, aboutit à une neutralisation de l'activité pro-inflammatoire du LPS par la LBP en absence de CD14. Ainsi, à forte concentration, donc durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, il a été observé que la sLBP fixe les LPS circulants dans le plasma et les neutralise.

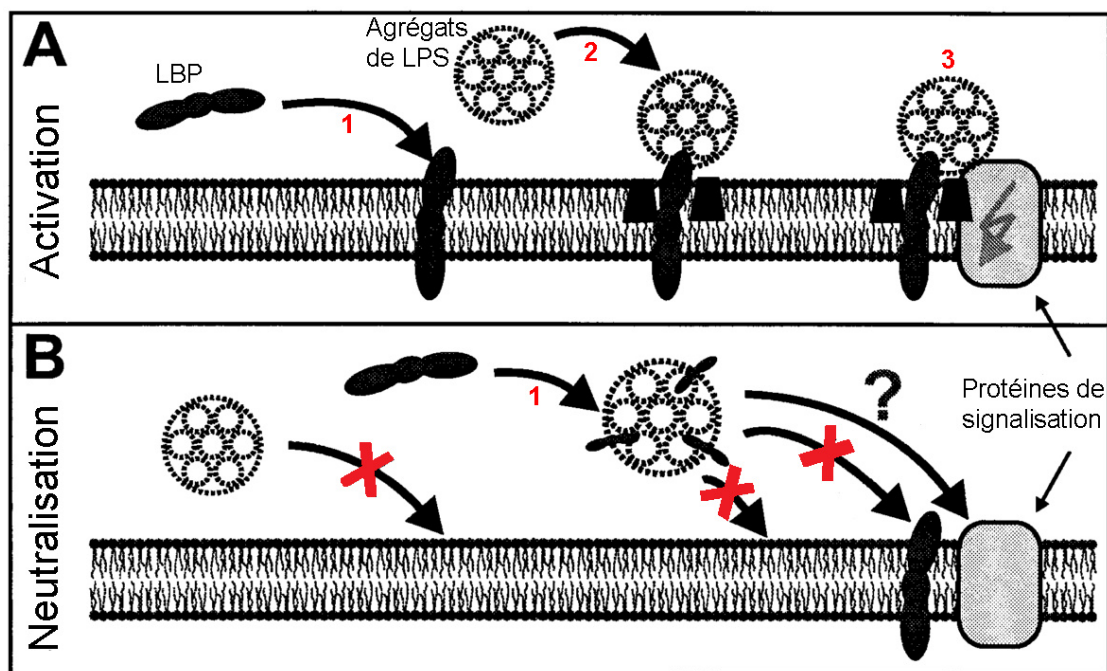


Figure 25. Schéma du mécanisme d'activation cellulaire par les LPS selon deux voies différentes, dépendantes de la LBP.

A. Mécanisme d'activation cellulaire par le LPS selon une voie dépendante de la LBP et indépendante de CD14.

B. Mécanisme de neutralisation du LPS par la LBP selon une voie indépendante de CD14.

Adapté de Gutsmann, 2001.

2. Formation du complexe hétérodimérique [(TLR4-MD-2)-LPS]

Dans le cas de la voie dépendante de CD14, le LPS ancré à la surface cellulaire par le mCD14 va déclencher la signalisation cellulaire via sa reconnaissance par le récepteur transmembranaire TLR4. Comme le démontre l'insensibilité aux LPS des souris C3H/HeJ et C57BL/10ScCr, qui sont des souris mutantes pour le gène *tlr4* [Politorak, 1998], ainsi que celle des souris TLR4-/- [Hoshino, 1999], le TLR4 est un élément essentiel dans la signalisation cellulaire en réponse aux LPS. Pourtant, le TLR4 seul n'est pas suffisant. En effet, la glycoprotéine de Différentiation Myéloïde 2 (ou *Myeloid differentiation factor 2*, MD-2) est nécessaire comme le démontre l'insensibilité au LPS d'un modèle cellulaire murin [Schromm, 2001] et des souris invalidées pour le gène *md-2* [Nagai, 2002 ; Visintin, 2001]. MD-2 est nécessaire, mais étant sécrétée et ne possédant pas de domaine transmembranaire, elle n'est elle-même pas suffisante pour déclencher seule la réponse cellulaire. C'est donc le complexe hétérodimérique qui va prendre en charge certaines chaînes acyles de la région lipide A du LPS d'abord par sa partie MD-2 [Gangloff, 2004 ; Gruber, 2004], ce qui va ensuite permettre à d'autres chaînes acyles de ce même lipide A d'interagir avec la partie TLR4 d'un autre complexe TLR4-MD-2 lié de la même façon à une autre molécule de LPS [Park, 2009 ; Bryant, 2010]. Ainsi, deux complexes TLR4-MD-2, chacun lié à une molécule de LPS différente, vont donc se dimériser pour déclencher la signalisation cellulaire.(Figure 26)

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

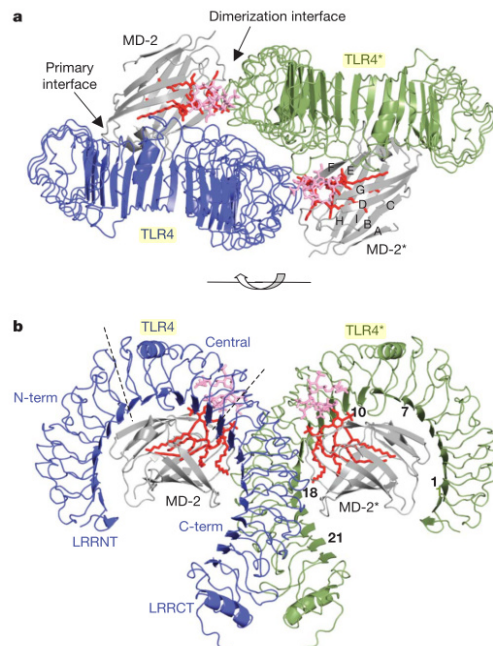


Figure 26. Modélisation structurale de la dimérisation de deux complexes hétérodimériques TLR4-MD2 liés chacun à une molécule de LPS.

a. Vue du dessus du dimère symétrique de complexes [(TLR4₂MD-2)₂-LPS].

b. Vue de côté du dimère symétrique de complexes [(TLR4₂MD-2)₂-LPS].

Le lipide A du LPS est coloré en rouge et les sucres du noyau interne du LPS sont représentés en rose. D'après Park, 2009.

3. Cascade de signalisation intracellulaire

La signalisation cellulaire déclenchée par l'activation de TLR4-MD2 emprunte principalement deux voies [Zughaier, 2006] (Figure 27) :

a. La voie de signalisation dépendante de MyD88

Elle fait intervenir deux protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) et TIRAP/MAL (Figure 27, à gauche). Elle induit une activation précoce de NF- κ B [Kagan, 2006]. Cette voie commence par le recrutement de TIRAP/MAL vers la membrane par son domaine de fixation au Phosphatidylinositol 4,5-biPhosphate (PIP2) et par sa fixation à l'homodimère TLR4, par son domaine TIR. Activée par la fixation du LPS,

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

selon un mécanisme inconnu, la kinase FAK va initier une cascade de phosphorylation impliquant les kinases Btk et Src (*SaRComa*), qui aboutit à la phosphorylation de TIRAP par Btk. Ainsi activée, TIRAP peut recruter MyD88 vers l'homodimère TLR4 [Kagan, 2006,]. MyD88 fixe ensuite IRAK4, puis IRAK1-TOLLIP, qui est aussitôt phosphorylée. Cette activation permet la dissociation et la libération d'IRAK1 et de TOLLIP. IRAK1 se lie alors à l'ubiquitine ligase TRAF6, qu'il ubiquitinye [Muzio, 1998]. Ainsi activée, TRAF6 s'associe au complexe TAK1-TAB2 (ou TAB3) [Cheung, 2004]. Cette association permet à TAB2 ou TAB3 d'activer TAK1, qui appartient à la famille des MAP3K [Qian, 2011 ; Kanayama, 2004]. TAK1 activée phosphoryle alors IKK, qui phosphoryle ensuite $\text{IKB}\alpha$, qui est finalement ubiquitinylé et dégradé.

Selon une autre voie, TAK1 activée est également capable de phosphoryler les MAP3K, MKK3/6 [Miltetic, 2007] et MKK4/7 [Huang, 2004], qui phosphorylent à leur tour, respectivement la P38 MAPK et la kinase JNK. Une fois activée P38 et JNK vont phosphoryler le facteur de transcription AP-1.

La levée de l'inhibition de NF- κ B par $\text{IKB}\alpha$ et sa translocation vers le noyau, ainsi que l'activation d'AP-1, déclenchent finalement l'activation de la transcription des gènes de l'inflammation par ces deux protéines.

b. La voie de signalisation dépendante de TRIF

Elle fait intervenir deux autres protéines adaptatrices TRIF et TRAM et induit une activation tardive de NF- κ B [Kagan, 2008 ; Tanimura, 2008 ; Figure 27, à droite]. Cette voie intervient plus tardivement que la voie dépendante de MyD88, car elle nécessite l'internalisation de l'homodimère de TLR4. En effet, la fixation de LPS en présence de CD14 déclenche parallèlement à la première voie l'endocytose de l'homodimère de TLR4, ce qui aboutit à la libération des complexes TIRAP/MAL-MyD88. TRAM initialement présente dans la membrane plasmique et se retrouvant dans l'endosome recrute TRIF [Kagan, 2008 ; Tanimura, 2008]. En présence de LPS, le complexe TRAM-TRIF se fixe à l'homodimère de TLR4 en présence de CD14, ce qui débouche sur deux voies possibles :

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

- Le recrutement du complexe TRAF3 par TRIF permet d'activer TBK1 [Hacker, 2006]. TBK1 activée en présence de IKK ϵ (forme inductible de IKK), phosphoryle IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*), qui se dimérise avant d'être transloqué dans le noyau où il active la transcription de IFN- β , qui active lui-même la transcription de plusieurs gènes de l'inflammation.
- Le recrutement de TRAF6 par l'intermédiaire de RIP1 (*Receptor-Interacting Protein kinase 1*) fixée à TRIF. Ainsi activée, TRAF6 s'associe au complexe TAK1-TAB2 (ou TAB3) [Cheung, 2004] comme dans la voie de signalisation dépendante de MyD88, pour aboutir de la même façon à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et donc à la transcription des gènes de l'inflammation inductibles par ceux-ci.

Une étude a montré que de ces deux voies de signalisation, celle dépendante de MyD88 constitue de loin la part la plus importante de la signalisation des LPS [Bjorkbacka, 2004]. Pourtant, l'invalidation de l'une de ces deux voies par déficience de MyD88 ou de TRIF résulte en une diminution significative de la réponse cytokinique aux LPS [Yamamoto, 2003].

Il est intéressant de noter que, contrairement aux LPS "*smooth*", les LPS "*rough*" peuvent être reconnus par les complexes TLR4/MD-2 en absence de CD14. Dans ce cas-là, seule la voie de signalisation MyD88-dépendante fonctionne [Godowski, 2005]. Dans tous les cas, ces deux voies mènent à la sécrétion de divers médiateurs de l'inflammation : cytokines, chimiokines, espèces radicalaires et médiateurs lipidiques.

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

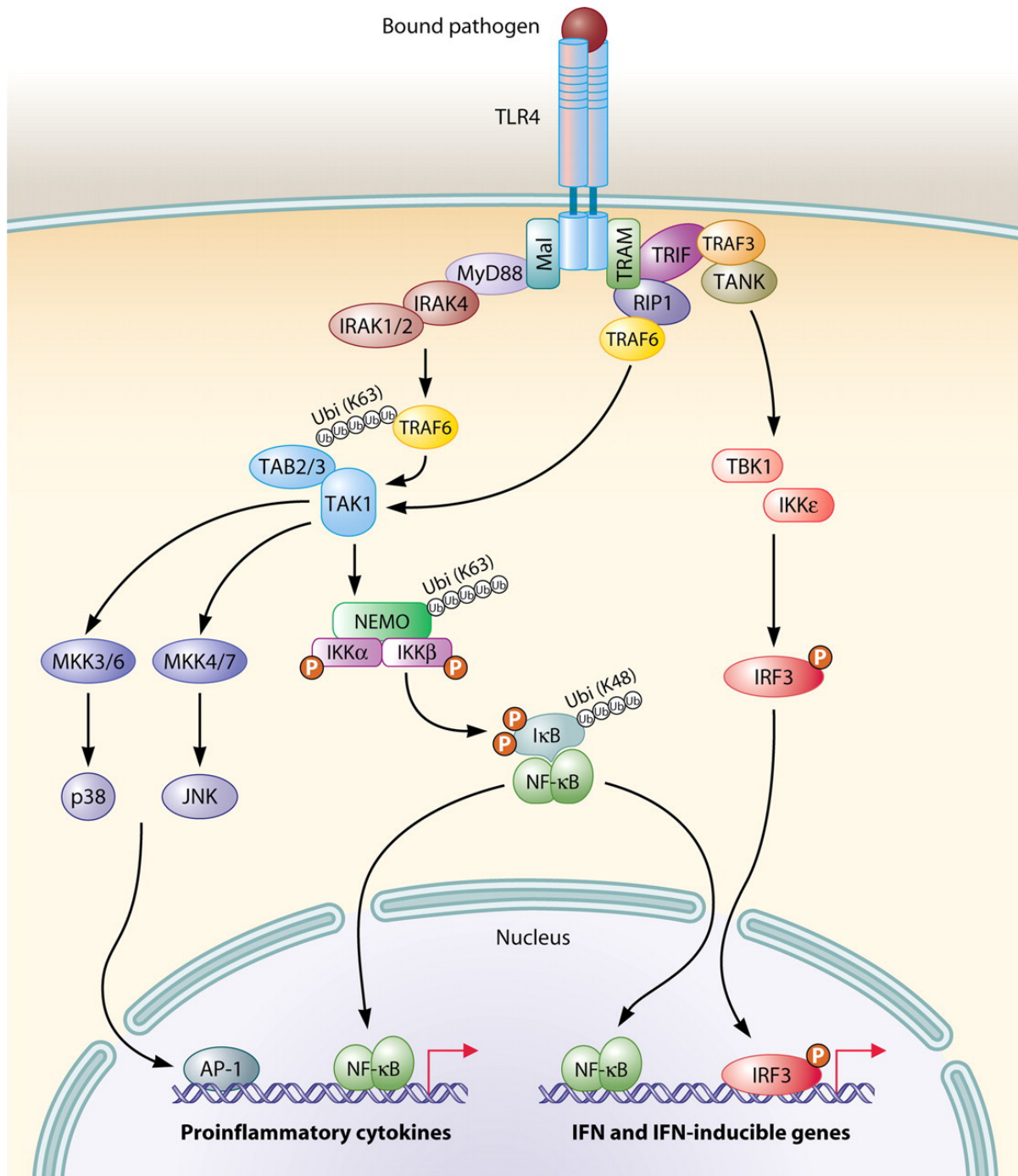


Figure 27. Schéma des voies de signalisation de TLR4.

A gauche. La voie de signalisation de TLR4 dépendante de MyD88.

A droite. La voie de signalisation de TLR4 indépendante de MyD88, mais dépendante de TRIF. D'après Mogensen, 2009.

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

4. Cascade des effets physiopathologiques

a. Mise en place de l'état inflammatoire

Une fois dans l'organisme, les LPS vont induire la sécrétion de médiateurs pro- et anti-inflammatoires, notamment de cytokines, qui sont directement responsables des effets physiopathologiques des LPS (Figure 28). Il semble en effet que la réponse inflammatoire soit biphasique, avec une prédominance de l'effet pro-inflammatoire dans sa première phase, qui est ensuite suivie d'une phase dépressive de cette réponse, durant laquelle l'effet anti-inflammatoire prédomine [Astiz, 1998]. Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central dans l'induction de cette réponse inflammatoire aux LPS. En effet, de nombreux sites de fixation de ce facteur de transcription ont été identifiés sur les promoteurs des gènes des médiateurs en question.

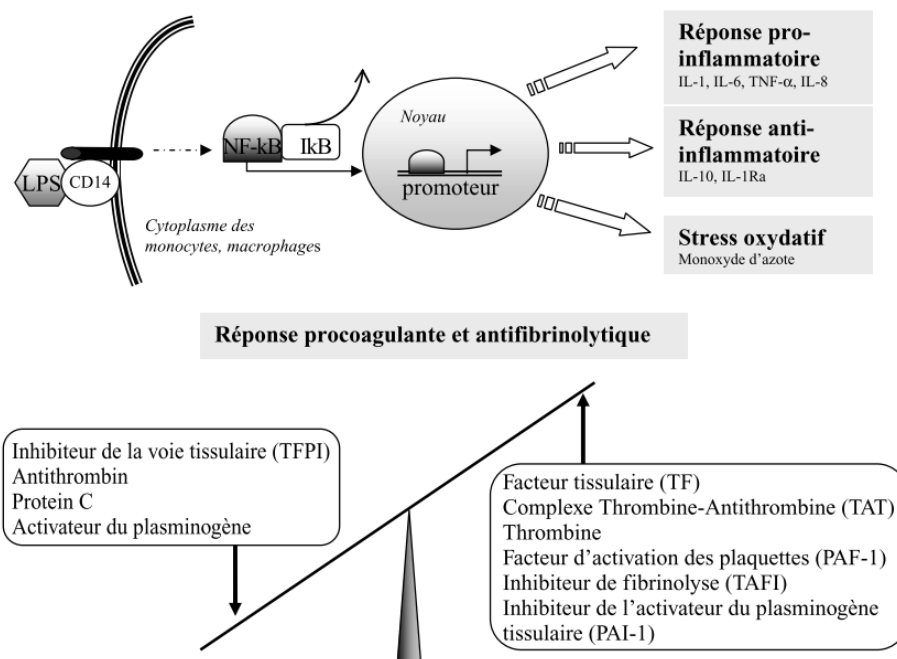


Figure 28. Représentation des effets biologiques de l'endotoxémie. D'après Amoureux, 2004.

b. Perte de la vasomotricité et de l'intégrité du système cardio-vasculaire

Dans cet état inflammatoire induit par l'internalisation de LPS, les premiers effets physiopathologiques surviennent au niveau de l'endothélium vasculaire avec une augmentation de l'adhérence leucocytaire et plaquettaire, et de l'activation de la coagulation [Aird, 2003]. L'ensemble de ces anomalies vasculaires est à l'origine du défaut de perfusion tissulaire, que l'on observe classiquement chez les patients atteints de sepsis [Kayal, 1998].

Ces dysfonctionnements vasculaires finissent par porter atteinte aux vaisseaux, qui se retrouvent alors en état de vasoplégie [Vallet, 1998 ; Winn, 1993]. Un vaisseau atteint de vasoplégie perd sa capacité à adapter son diamètre (par vasodilatation ou vasoconstriction) aux paramètres hémodynamiques (débit et pression sanguins) et biochimiques (concentrations des gaz du sang dont l'oxémie) de son environnement. Le résultat de cette vasoplégie est une réduction du volume sanguin circulant, que l'on nomme hypovolémie.

Les LPS ont également un effet cytotoxique (nécrose et apoptose) direct sur les cellules musculaires striées cardiaques, dont on ne comprend pas clairement le mécanisme [Parillo, 1993]. Le dysfonctionnement myocardique résultant, associé à l'hypovolémie sus-décrite, aboutissent à un défaut du débit cardiaque.

c. Mise en place d'une Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD)

Durant une endotoxémie, l'activation du système pro-coagulant a lieu selon la séquence suivante :

- activation anormale des facteurs pro-coagulants ;
- épuisement des facteurs de la coagulation ;
- activation des plaquettes, conduisant ces dernières à former des thrombus dans les capillaires sanguins.

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

Ce phénomène peut conduire à une occlusion systémique des petits vaisseaux que l'on appelle Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD).

En outre, un effet indirect de la cytokine pro-inflammatoire InterLeukine-6 (IL-6) est impliqué dans la CIVD. En effet l'IL-6 a un effet inhibiteur sur le système anti-coagulant, mais pas sur la fibrinolyse [Stouthard, 1996 ; van der Poll, 1994].

d. Choc endotoxinique

La cascade d'effets physiopathologiques sus-cités, porte atteinte au système cardio-vasculaire et aboutit donc au choc endotoxinique. Un choc est un état qui résulte d'une inadéquation brutale entre les besoins métaboliques en oxygène et la capacité du système cardio-vasculaire et/ou respiratoire à assurer le transport et la distribution de cet oxygène. Le choc endotoxinique aboutit à un Syndrome de Défaillance MultiViscérale (SDMV), qui peut être fatal. Lors d'un SDMV, le pronostic est d'autant plus défavorable, que le nombre d'organes atteints est important. Ce pronostic peut être basé sur un score de défaillance multiviscérale. Il en existe plusieurs types [Le Gall, 2002], parmi lesquels un des plus récents est le score SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) [Vincent, 1996]. Ce score se base sur six critères de défaillance (Tableau 5) :

- la défaillance respiratoire (Diminution du ratio Pression atmosphérique en Oxygène sur Fraction Inspirée en Oxygène ou ratio $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$) ;
- la défaillance cardio-circulatoire (Diminution de la Pression Artérielle Moyenne (PAM) et augmentation de la concentration de catécholamines) ;
- les désordres de coagulation (Diminution des plaquettes) ;
- les anomalies neurologiques (Diminution du score de Glasgow. Le score de Glasgow est une échelle d'évaluation de l'état de conscience)
- la défaillance rénale (Augmentation de la créatinémie) ;
- la défaillance hépatique (Augmentation de la bilirubinémie).

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

SOFA	1	2	3	4
Respiratoire PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200 Avec assistance ventilatoire	< 100
Coagulation Plaquettes (X10 ³ /mm ³)	< 150	< 100	< 50	< 20
Hépatique Bilirubine (mg/l)	12-19	20-59	60-119	> 120
Cardio-vasculaires* PAM (mmHg) & Catécholamines (µg/kg/min)	PAM < 70	Dopa < 5 Dobu	Dopa > 5 Adré, NorAdré < 0,1	Dopa > 5 Adré, NorAdré > 0,1
Neurologique Score de Glasgow (Pts)	13-14	10-12	6-9	< 6
Rénal Créatininémie (mg/l)	12-19	20-34	35-49	> 50

* Dobu : dobutamine ; Adré : adrénaline ; Noradré : noradrénaline

Tableau 5. Les six critères de défaillance du score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment). *D'après Vincent, 1996.*

Le score SOFA tient compte des éléments cliniques et biologiques propres aux états d'infection grave avec une bonne puissance pronostique [Vincent, 1998]. Pourtant aucun score pronostique n'est parfait. Par exemple, le score SOFA met l'accent sur le critère cardio-vasculaire au détriment d'autres éléments [Vincent, 1998]. Le choix du type de

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

score pronostique doit donc se faire au cas par cas en considérant l'objectif du pronostic, l'étiologie du sepsis et les antécédents du patient.

II. Relation structure-agrégabilité-activité biologique des LPS

1. Structure chimique du lipide A

Les protéines connues pour fixer le LPS, notamment celles impliquées dans sa signalisation cellulaire (LBP, CD14 et TLR4/MD-2), n'interagissent pas de la même façon avec tous les types de LPS. Considérant que le lipide A est reconnu comme le principe actif du LPS, la diversité des structures chimiques primaires du lipide A peut donc expliquer cette différence de prise en charge par les protéines fixant le LPS. Néanmoins, il faut également tenir compte des différences de conformation du lipide A, notamment de ses chaînes acyles, qui ont été décrites précédemment. Les premières études structurales du lipide A ont porté sur un choix aléatoires de LPS issus de souches bactériennes différentes, présentant pourtant des structures très voisines. Ce constat fondé sur un cas particulier et fortuit, a pourtant été généralisé, faisant du lipide A une région unanimement considérée comme "très conservée" [Gmeiner, 1969].

Par la suite, il a pourtant été démontré qu'il existe une grande diversité structurale dans l'ensemble des lipides A des différentes souches bactériennes, et que des modifications de structures minimales, comme la déphosphorylation [Takayama, 1984], peuvent entraîner de grandes différences d'activité pro-inflammatoire : la capacité de la LBP à transférer le LPS vers la membrane du macrophage dépend en effet de la charge négative nette de la molécule de LPS [Schromm, 1996]. La fluidité des chaînes acyles du lipide A influence également l'efficacité de la prise en charge du LPS par la LBP [Wellinghausen, 1996].

Cette fluidité est le fait de plusieurs facteurs comme le nombre, mais surtout la taille des chaînes acyles. En effet, la taille des chaînes acyles secondaires du lipide A s'est révélée être un facteur clé de l'activité biologique pour les LPS : une longueur de 8 atomes de carbone assure une activité minimale, alors que 10 atomes de carbone permettent aux LPS d'exercer une activité pro-inflammatoire maximale [Stöver, 2004].

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

Un autre paramètre physico-chimique susceptible d'influencer la fluidité des chaînes acyles du lipide A, a été étudié par Pedron T. et coll. : en fonction de la configuration absolue des carbones asymétriques du lipide A, le LPS est biologiquement actif ou inactif [Pedron, 1992]. Donc, ce type de modification peut changer un lipide A actif en lipide A inactif, bien que n'affectant pas sa structure chimique primaire. L'ampleur de l'impact de cette modification démontre l'importance de premier ordre de la conformation spatiale du lipide A dans la détermination de son activité biologique. C'est à partir de ce constat qu'a été modélisé et validé le concept de "conformation endotoxinique" : plus la forme géométrique d'un lipide A tend vers celle d'un cône, plus le LPS dont il est constitutif présentera une activité biologique importante [Seydel, 2000 ; Shromm, 2007]. Or, cette conicité peut être quantifiée par l'angle d'inclinaison θ entre l'axe du squelette diglucosamine diphosphate du lipide A et le plan de base défini par l'extrémité des chaînes acyles (Figure 29). Selon Seydel et coll., plus l'angle d'inclinaison θ est important plus le LPS est biologiquement actif [Seydel, 2000].

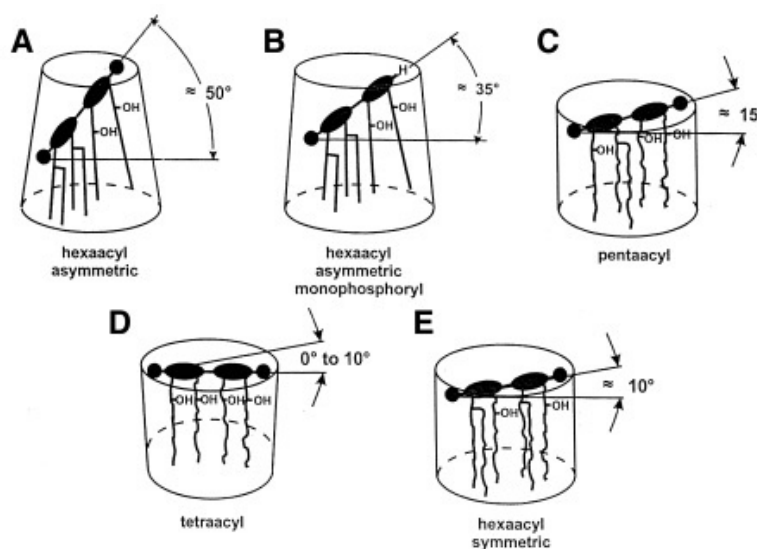


Figure 29. Représentation des conformations de lipides A différant par le nombre (4, 5 ou 6) et la composition de chaînes acyles (symétriques versus asymétriques), ou le degré de phosphorylation (mono- versus di-phosphoryle).

A. Lipide A hexaacyle asymétrique.

D. Lipide A tétraacyle.

B. Lipide A hexaacyle asymétrique monophosphoryle.

E. Lipide A hexaacyle symétrique.

C. Lipide A pentaacyle.

D'après Seydel, 2000.

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

2. Etat d'agrégation des LPS

Il est également nécessaire de tenir compte de l'état agrégé ou désagrégé d'un LPS pour prédire son activité biologique. En effet, il a été démontré dans un premier temps, que la forme la plus active du LPS est la forme désagrégée [Takayama, 1990]. Pourtant, les études respectives de Shnyra A. et coll. et de Müller M. et coll. ont ensuite montré le contraire [Shnyra, 1993 ; Müller, 2003], la forme agrégée apparaissant alors biologiquement comme la plus active. Cette contradiction apparente est probablement due au fait que les LPS en question dans ces études sont différents et adoptent donc des architectures supramoléculaires différentes.

Ces complexes supramoléculaires de LPS présentent donc une activité biologique qui est fonction de leur architecture, elle-même fonction de la structure chimique de leurs LPS constitutifs [Seydel, 2000 ; Figure 30] :

- les architectures hexagonale (H_{II}) et cubique (Q) donnent les complexes supramoléculaires biologiquement les plus actifs ;
- l'architecture lamellaire (L) donne des complexes supramoléculaires de LPS biologiquement inactifs ;
- l'architecture hybride lamellaire/cubique (L/Q) est celle des complexes supramoléculaires de LPS présentant une activité biologique intermédiaire.

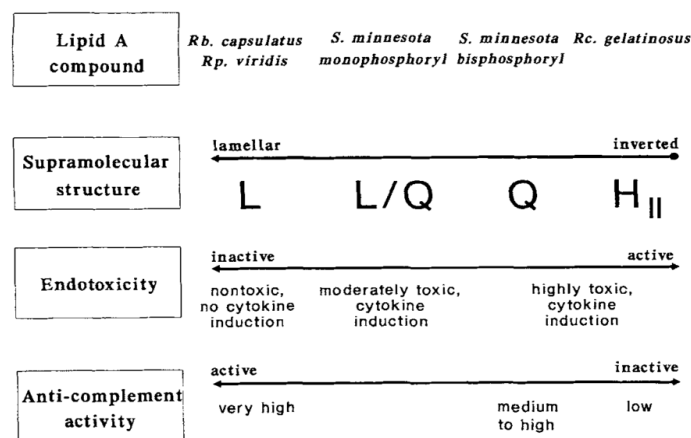


Figure 30. Représentation de la relation entre l'architecture supramoléculaire et l'activité biologique des LPS. D'après Brandenburg, 1993.

Etude bibliographique

C. Endotoxémie

Après avoir mis en évidence :

- d'une part la relation entre conformation du lipide A et activité biologique du LPS correspondant ;
- d'autre part la relation entre architecture des complexes supramoléculaires de LPS et activité biologique des LPS constitutifs ;

Nous pouvons faire le lien entre conformation du lipide A et architecture des complexes supramoléculaires de LPS. En effet, le type d'architecture adoptée par les complexes supramoléculaires de LPS est dépendant de la conicité et donc de l'angle d'inclinaison θ des lipides A constitutifs des LPS en question [Seydel, 2000], de la façon suivante :

- les complexes supramoléculaires L sont formés par des LPS dont θ est inférieur à 25° ;
- les complexes supramoléculaires L/Q sont formés par des LPS dont θ est compris entre 30° et 40° ;
- les complexes supramoléculaires Q sont formés par des LPS dont θ est compris entre 45° et 60° ;
- les complexes supramoléculaires $H_{||}$ sont formés par des LPS dont θ est compris entre 65° et 75° .

De toute évidence, l'activité biologique des LPS est donc régie à deux niveaux, au niveau monomérique par la conformation du lipide A et au niveau supramoléculaire par l'architecture adoptée par les LPS après agrégation.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

D. TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL ET DU LPS

La lipidomique et l'immunologie sont des champs de recherche distincts. Pourtant, de plus en plus de découvertes scientifiques poussent à penser que le métabolisme des lipides et l'immunité innée sont liés. Par exemple, la réponse inflammatoire affecte négativement le transport inverse du cholestérol en diminuant :

- l'expression des transporteurs du cholestérol ;
- la qualité (changement de composition) et la taille des lipoprotéines HDL [Jahangiri, 2009] ;
- l'assimilation et l'excrétion par le foie du cholestérol transporté par ces lipoprotéines [Annema, 2010 ; Malik, 2011 ; McGillicuddy, 2009].

Par ailleurs, dans l'athérosclérose, les macrophages tout en étant des acteurs majeurs de l'immunité innée vont aussi phagocyter des lipoprotéines LDL oxydées jusqu'à devenir des cellules spumeuses formant la plaque d'athérome [Ross, 1999].

Quant au LPS qui est un glycolipide phosphorylé, sa proximité structurale avec celle d'un phospholipide laisse facilement concevoir l'existence de transporteurs communs, les lipoprotéines, et un chevauchement des voies biologiques et physiologiques de prise en charge et de transport du LPS et des lipides. Cette similitude est parfaitement illustrée *in vivo* par les systèmes d'élimination des LPS et du cholestérol selon une voie commune dite de transport inverse, par l'intermédiaire des lipoprotéines de haute densité (HDL) depuis la périphérie jusqu'au foie.

I. Transport inverse du cholestérol

Les tissus périphériques ne sont pas capables d'éliminer le cholestérol excédentaire préalablement obtenu soit par synthèse endogène, soit par assimilation via la voie entéro-hépatique. C'est donc par un retour vers le foie que ce cholestérol excédentaire est excrété dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires. Ce retour du cholestérol vers le foie est assuré par une voie métabolique que l'on nomme le transport inverse du

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

cholestérol [Glomset, 1968], et dont l'acteur central est la lipoprotéine HDL. C'est par un enrichissement progressif en cholestérol de ces lipoprotéines, passant progressivement de HDL natives à HDL matures, que le cholestérol excédentaire va revenir vers le foie.

1. Amorçage et prise en charge de l'excès de cholestérol cellulaire périphérique par les lipoprotéines HDL

Dans un premier temps, le cholestérol extra-hépatique excédentaire est pris en charge par les HDL natives ou préβHDL. Ces lipoprotéines sont constituées d'une molécule d'apolipoprotéine apoA-I (protéine synthétisée par le foie) associée à quelques molécules de phospholipides. Dans la phase d'amorçage du transport inverse du cholestérol, l'efflux de cholestérol non estérifié a lieu de la membrane plasmique des cellules des tissus périphériques vers les lipoprotéines préβHDL du milieu extracellulaire via les transporteurs ABCA1 [Gautier, 2011, Figure 31].

Ce transport du cholestérol a aussi une composante passive régie par la loi d'action de masse : le cholestérol va du compartiment où il est le moins concentré vers celui où il est le plus concentré [Phillips, 2014].

Cependant, cet efflux vers les lipoprotéines préβHDL, notamment dans une phase plus avancée du transport inverse du cholestérol, est favorisé par des transporteurs protéiques spécifiques (Figure 31) :

- ABCA1, protéine transmembranaire qui lie l'apoA-1 faiblement lipidée pour catalyser la translocation du cholestérol libre et des phospholipides à travers la membrane plasmique. ABCA1 interagit exclusivement avec les lipoprotéines préβHDL. Donc, ce transporteur intervient précocement dans le transport inverse du cholestérol ;
- SR-BI, récepteur qui favorise l'efflux de cholestérol en fixant les lipoprotéines préβHDL et HDL à la membrane plasmique et en favorisant la réabsorption du cholestérol membranaire au niveau des cavéoles de divers types cellulaires [Acton,

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

1996 ; Williams, 1999 ; Rothblat, 1999 ; Krieger, 2001]. SR-BI intervient plus tardivement dans le transport inverse du cholestérol ;

- ABCG1, transporteur protéique qui favorise l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages en interagissant avec les α HDL. Son rôle est donc encore plus tardif dans le transport inverse du cholestérol [Tall, 2008].

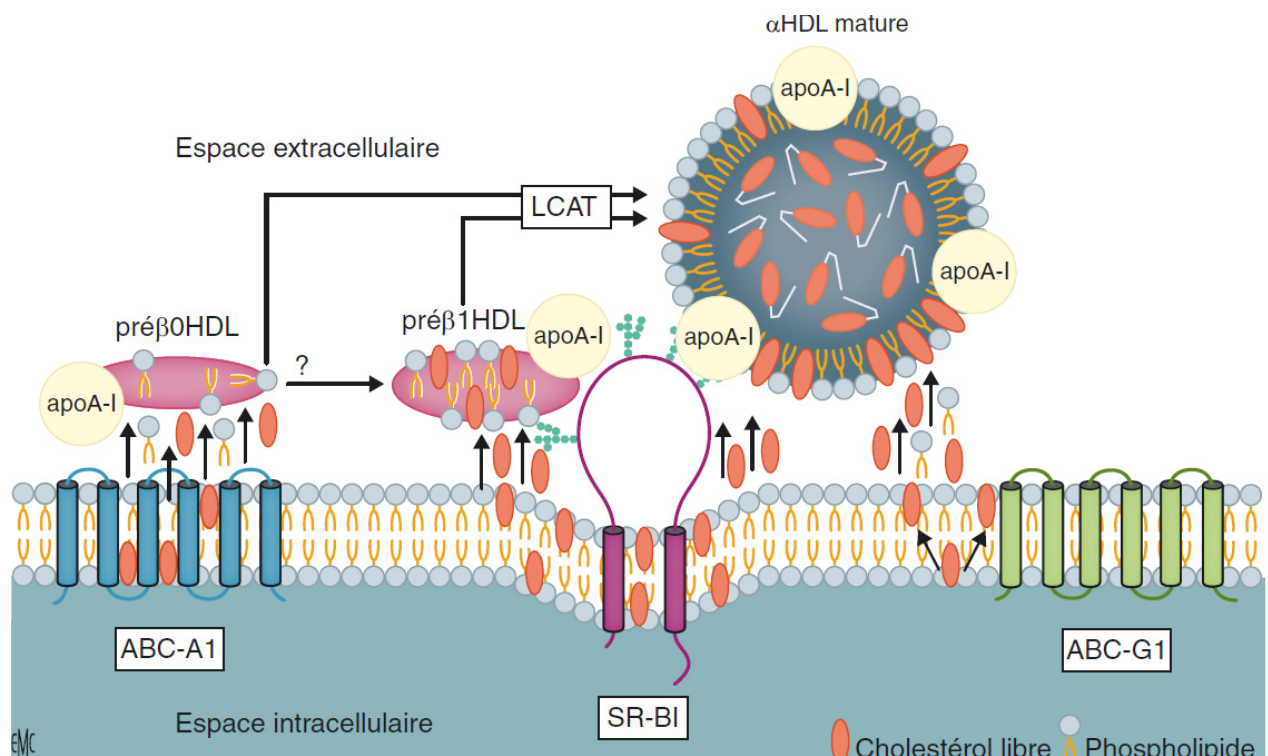


Figure 31. Représentations des transporteurs protéiques spécifiques impliqués dans l'efflux du cholestérol. D'après Gautier, 2011.

2. Maturation et remodelage des lipoprotéines HDL

a. Intervention de l'enzyme Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT)

Une fois chargées en cholestérol libre, les lipoprotéines préβHDL vont rencontrer dans le compartiment intravasculaire l'enzyme spécifique LCAT (Figure 32), synthétisée et sécrétée par le foie. Cette enzyme va s'associer aux préβHDL et ultérieurement aux HDL

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

en cours de maturation. Cette association lui permet d'être activée par son cofacteur l'apoA-1 pour estérifier le cholestérol libre présent à la surface des préβHDL ou des HDL en cours de maturation. Une fois estérifié, le cholestérol migre de la surface vers le cœur hydrophobe de la lipoprotéine [Jonas, 2000], entraînant une restructuration de cette dernière, aboutissant à la formation de lipoprotéines matures ou αHDL.

De par son action, la LCAT stimule indirectement l'efflux de cholestérol cellulaire. En effet, la transestérification du cholestérol libre des lipoprotéines préβHDL nécessite des groupes acyles qui sont fournis par les phospholipides localisés à la surface des lipoprotéines préβHDL ou HDL en cours de maturation. Cette consommation des phospholipides et du cholestérol libres favorise, selon la loi d'action de masse, un flux net de phospholipides et de cholestérol libre des tissus périphériques vers les lipoprotéines HDL en cours de maturation.

b. Intervention combinée de la Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol (ou *Cholesteryl Ester Transfer Protein*, CETP) de la lipase hépatique (LH) et de la lipase endothéliale (LE)

Chez l'Homme, tout au long de ce transport inverse du cholestérol, les esters de cholestérol sont transférés des lipoprotéines αHDL vers les lipoprotéines contenant l'apoB (IDL, LDL et surtout VLDL) en échange de triglycérides. Ce transfert est catalysé par la CETP (Figure 32) : Suite à l'action de la CETP conduisant au remplacement des esters de cholestérol, non hydrolysables, par des triglycérides au niveau du cœur des HDL, ces dernières constituent de bons substrats pour la LH. Cette dernière hydrolyse les triglycérides et provoque ainsi une réduction du cœur hydrophobe des αHDL (Figure 32). La LE est une enzyme produite par les cellules endothéliales, à la surface desquelles elle se retrouve finalement ancrée. Cette enzyme hydrolyse les phospholipides à la surface des HDL [Rader, 2000]. Ces modifications liées à la CETP, la LH et la LE, qui ont lieu tout au long du transport inverse du cholestérol, vont déstabiliser la lipoprotéine αHDL jusqu'à provoquer sa dissociation en une particule αHDL de petite taille et une particule préβHDL constituée de composants de surface de la HDL d'origine.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

D'autre part, le transfert des esters de cholestérol sous l'action de la CETP, des HDL vers les lipoprotéines à apoB, offre une voie alternative de retour du cholestérol vers le foie (Figure 32). Néanmoins, ce shunt du transport inverse du cholestérol n'existe pas chez les rongeurs, car ils sont dépourvus d'activité CETP.

c. Intervention de la Protéine de Transfert des Phospholipides (ou *PhosphoLipid Transfer Protein*, PLTP)

Dans leur processus de maturation, les lipoprotéines HDL peuvent également subir l'action de la PLTP initialement décrite pour sa capacité à échanger des phospholipides entre les différentes classes de lipoprotéines (Figure 32). Dans un premier temps, la fonction principale de la PLTP a été définie comme sa capacité à faire fusionner deux lipoprotéines α HDL3 de taille intermédiaire pour générer des lipoprotéines α HDL2 de grande taille et des lipoprotéines pré β HDL [Lagrost, 1998]. Pourtant, la stabilité de structure et de composition des HDL chez des souris hétérozygotes déficientes en PLTP a permis de nuancer et relativiser ce rôle de la PLTP, tout en orientant vers d'autres fonctions possibles de cette protéine.

Ainsi, il est apparu qu'en plus des phospholipides, la PLTP peut prendre en charge de nombreux types de lipides amphipatiques [Quintão, 2010], dont les LPS.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

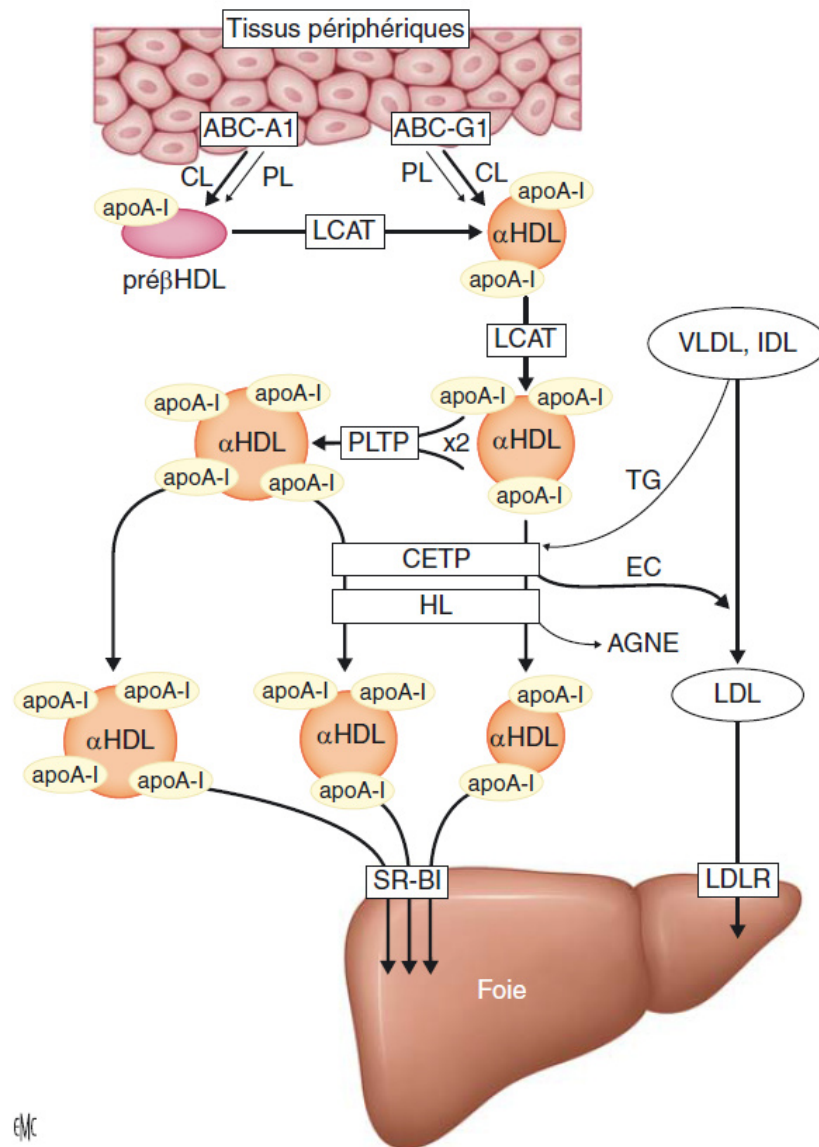


Figure 32. Schéma du métabolisme des Lipoprotéines de Haute Densité (*High Density Lipoproteins*, HDL) et transport inverse du cholestérol. D'après Gautier, 2011.

3. Captage hépatique du cholestérol et son excrétion biliaire

Finalement, la fixation des HDL et le prélèvement sélectif des esters de cholestérol par le récepteur SR-BI, constituent la dernière étape du transport inverse du cholestérol [Acton, 1996 ; Figure 33]. Par rapport à la famille des récepteurs des lipoprotéines LDL (ou *LDL Receptor* LDLR), le récepteur SR-BI diffère non seulement par sa structure, mais également par son mécanisme de prélèvement des esters de cholestérol. Il s'agit en effet

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

d'une protéine constituée de deux domaines transmembranaires associés entre eux par un domaine extracellulaire glycosylé, capable de fixer les HDL et de déclencher le prélèvement d'esters de cholestérol sans endocytose, ni dégradation lysosomale de la lipoprotéine.

Suite à cela, les esters de cholestérol ayant pénétré dans les hépatocytes sont métabolisés par une voie extralysosomale, avant d'être orientés vers les canalicules biliaires, dernier cheminement avant leur excrétion biliaire sous forme de cholestérol dans la bile.

A l'inverse, il est intéressant de noter que les acides biliaires sont, quant à eux, le résultat d'une synthèse qui s'alimente de l'internalisation et de la dégradation des particules VLDL et LDL (Figure 33); celles-ci étant les effecteurs de la voie alternative de retour du cholestérol en présence de CETP.

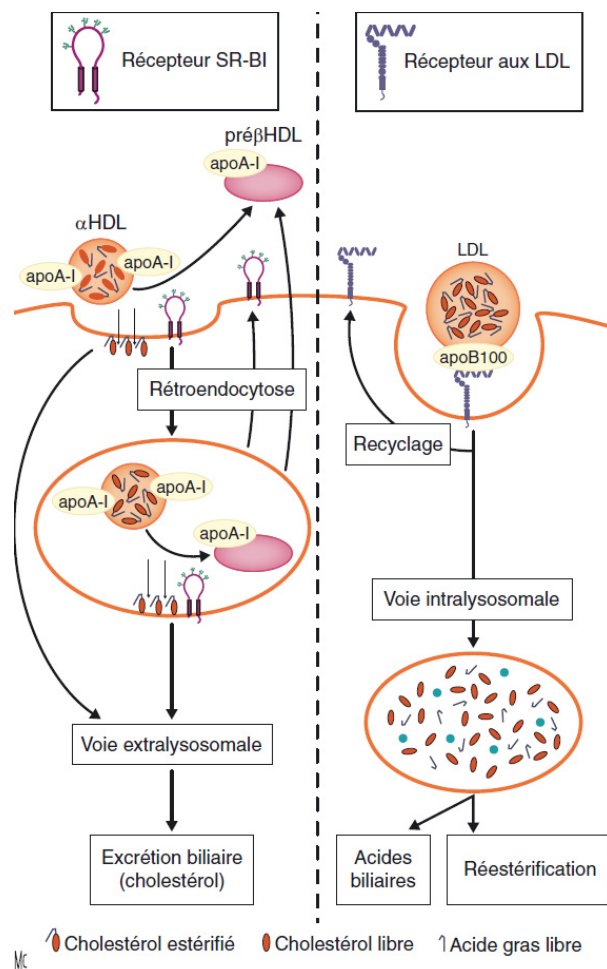


Figure 33. Schéma du métabolisme hépatique du cholestérol. D'après Gautier, 2011.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

II. Transport inverse du LPS

Chez les mammifères, le transport inverse du cholestérol et la voie métabolique d'élimination du LPS, partagent de nombreux points communs : ces deux molécules empruntent une voie similaire de transport via les lipoprotéines, notamment les HDL qui seront finalement captées par les récepteurs hépatiques [Glomset, 1968 ; Hampton, 1991 ; Acton, 1996]. En raison de ces similitudes, les mécanismes d'épuration plasmatique peuvent être baptisés, par analogie au transport inverse du cholestérol, transport inverse du LPS. De plus, la CETP et la PLTP, découverte en tant que protéines de transfert des lipides, sont susceptibles de jouer un rôle dans l'élimination des LPS. Du point de vue du double rôle de ces deux protéines, il est notable qu'elles fassent partie de la famille LT/LBP qui compte deux autres protéines connues pour lier les LPS : la LBP et la BPI. En effet, cette appartenance commune à une même famille protéique souligne encore plus l'étroite connexion entre les métabolismes du cholestérol et des LPS.

1. Implication des protéines LT/LBP dans le métabolisme des LPS

De nombreuses molécules amphiphiles et lipophiles (LPS, phospholipides, cholestérols non estérifiés... etc.) peuvent s'associer et se dissocier de la surface des lipoprotéines de manière spontanée [Roseman, 1980 ; McLean, 1981 ; Lund-Katz, 1982 ; Massey, 1984 ; Patton, 1985]. Toutefois, la grande rapidité des échanges que l'on observe dans le plasma témoigne de l'implication de protéines de transfert [Tall, 1979, 1980, 1981, 1982 ; Pownall, 1991]. Ces dernières, de par leur forte homologie de structure, forment la famille des LT/LBP incluant la BPI, la LBP, la CETP et la PLTP. Toutes ces protéines sont caractérisées par une structure tridimensionnelle en forme de boomerang organisée selon deux domaines contenant chacun une poche liant les lipides [Beamer, 1997].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

a. La BPI

i. Structure et localisation

La BPI est une protéine d'environ 55 kDa [Tobias, 1997] essentiellement ancrée à la membrane des granulations azurophiles des polynucléaires neutrophiles [Weiss, 1987 ; Dentener, 1996], ainsi qu'à la membrane des granulocytes en général et des monocytes [Dentener, 1996 ; Weersink, 1993]. Dans les conditions physiologiques, la BPI n'est pas détectée dans le plasma [Dentener, 1995]. La BPI a une structure tridimensionnelle dont la forme rappelle celle d'un boomerang [Beamer, 1997], avec deux domaines similaires et symétriques. Chacun de ces domaines possède une poche apolaire contenant une molécule de phosphatidylcholine. Dans la structure de la BPI, on trouve également de nombreuses régions chargées positivement.

ii. Fonction

La BPI présente une activité bactéricide : elle se lie directement aux LPS ancrés à la surface des bactéries Gram-négatif. Cette liaison engendre une déstabilisation de l'enveloppe bactérienne (Figure 34), un ralentissement de la croissance et une augmentation de la mortalité des bactéries [Weiss, 1984 ; Gray, 1989].

Chez la souris, il a été démontré que la BPI a un effet protecteur contre l'endotoxémie [Jiang, 2004 ; Alexander, 2004]. En effet, la BPI est capable d'inhiber la réponse pro-inflammatoire induite par les LPS selon la voie dépendante de LBP/CD14 [Wilde, 1994].

De plus, selon Tobias P.S. et coll., la BPI favorise l'agrégation des monomères de LPS en des complexes supramoléculaires de plus grande taille [Tobias, 1997 ; Figure 34], dont elle facilite ensuite la neutralisation [Domingues, 2009 ; Figure 34].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

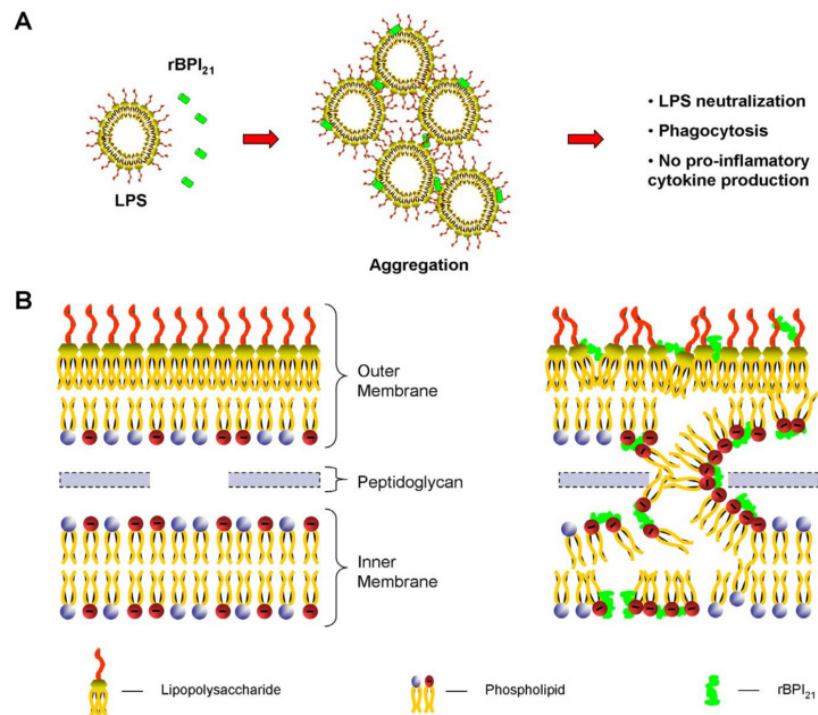


Figure 34. Représentation du mécanisme d'action de la BPI. D'après Domingues, 2009.

b. La LBP

i. Structure et localisation

La LBP est une protéine plasmatique soluble (sLBP) ou membranaire (mLBP) d'environ 60 kDa, dont la synthèse a lieu dans les hépatocytes [Tobias, 1986; Tobias, 1989]. Les séquences d'acides aminés de la LBP et de la BPI présentent 44% d'homologie [Schumann, 1990]. D'ailleurs, l'homologie de séquence est particulièrement forte entre un ensemble de résidus cationiques exposé au niveau de la région N-terminal de ces deux protéines en forme de boomerang [Beamer, 1999]. Cet ensemble de résidus cationiques semble être le domaine de fixation du LPS pour la LBP [Schumann, 2000 ; Lamping, 1996].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

i. Fonction

Malgré leur forte homologie de séquence, la LBP contrairement à la BPI, favorise la désagrégation des complexes supramoléculaires de LPS [Tobias, 1997] en s'intégrant dans les complexes supramoléculaires de LPS [Gazzano-Santoro, 1994 ; Tobias, 1989].

La LBP transfère aussi les LPS de la membrane externe des bactéries Gram-négatif directement à la membrane des monocytes [Schumann, 1990]. De ce fait, elle est capable de potentialiser la réponse cellulaire aux LPS en améliorant l'interaction de ces derniers avec le CD14 en formant un complexe hétérotrimérique stable, LPS-sLBP-CD14 [Thomas, 2002] selon la séquence suivante : association du LPS à la sLBP, suivi de la fixation du complexe hétérodimérique LPS-LBP au CD14 [Wright, 1990 ; Han 1994].

Toutefois, il a aussi été montré qu'indépendamment de CD14, la LBP peut jouer deux autres rôles antagonistes entre eux, selon sa concentration plasmatique [Gutsmann, 2001]. En effet, selon Gutsmann T. et coll., si la fixation de la LBP à la membrane des PMN est préalable à la formation du complexe LPS-LBP, alors la LBP peut avoir un rôle activateur de la réponse inflammatoire indépendamment de CD14 [Gutsmann, 2001]. Ainsi, à faible concentration, la mLBP peut lier les LPS circulants pour que ces derniers induisent une réponse cellulaire selon cette voie. Dans le cas contraire, une formation du complexe LPS-LBP avant la fixation de la LBP à la membrane des PMN, aboutit à une neutralisation de l'activité pro-inflammatoire des LPS par la LBP [Lamping, 1998] en favorisant leur désagrégation et leur transfert vers les lipoprotéines [Hailman, 1996]. Ainsi, durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire où la concentration plasmatique de la LBP augmente [Myc, 1997], il a été observé que la sLBP fixe les LPS circulants dans le plasma et les neutralise.

c. La CETP

i. Structure et localisation

La CETP est une protéine plasmatique soluble composée de 476 acides-aminés et d'environ 53 kDa présentant aussi une forme en boomerang [Zhang, 2012].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

ii. Fonction

Elle assure l'ensemble des échanges nets de lipides neutres (CE et TG) et en partie le transfert des phospholipides entre les différentes fractions lipoprotéiques [Abbey, 1985 ; Hesler, 1988 ; Yen, 1989 ; Brown, 1990 ; Lagrost, 1994 ; Tall, 1995]. Suivant la loi d'action de masse, elle enrichit les VLDL et les LDL en esters de cholestérol, qu'elles prélèvent à partir des HDL et elle enrichit en retour les HDL en triglycérides [Lagrost, 1994].

L'expression de la CETP, ainsi que son activité de transfert sont diminuées par la présence de LPS [Masucci-Magoulas, 1995]. La CETP ne semble pas transférer directement les LPS ; en revanche elle est susceptible de modifier leur métabolisme en diminuant la durée de vie des HDL [Collet, 1999 ; Zhou, 2006]. De toutes les protéines de la famille LT/LBP, c'est celle dont l'action directe sur le métabolisme des LPS semble la plus réduite.

d. La PLTP : comparaison avec les autres protéines LT/LBP

i. Structure et localisation

La PLTP humaine est une protéine plasmatique associée aux lipoprotéines HDL [Oka, 2000] et constituée de 476 acides aminés issus d'une pré-protéine de 493 acides aminés contenant un peptide signal de 17 acides aminés. Cette séquence peptidique permet de prédire une masse moléculaire d'environ 55 kDa, alors que la masse déterminée par électrophorèse est d'environ 80 kDa [Day, 1994]. Cette différence est due à la présence de 6 sites de N-glycosylation : en effet, sous son état natif, elle est glycosylée et possède une masse d'environ 80 kDa, alors qu'elle ne pèse qu'environ 55 kDa suite à son traitement par des glycosidases [Huuskonen, 1998].

Le gène et la protéine PLTP ont été fortement conservés au cours de l'évolution. Ainsi, il existe une forte homologie entre la protéine humaine et la protéine correspondante chez le cochon (93%), chez la souris (83%), et enfin chez le lapin (85%)

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

[Gander, 2002 ; Pussinen, 1997 ; Tu, 1997 ; Alberts, 1995 ; Jiang, 1995]. Par exemple, la PLTP murine diffère de la PLTP humaine par l'existence d'un septième site de glycosylation.

Avec un score de 20% [Day, 1994] fondé pour l'essentiel sur des correspondances de séquences peptidiques au niveau de la partie centrale de leur forme en boomerang [Huuskonen, 1999], l'homologie de séquence entre la PLTP et les autres protéines de la famille LT/LBP est faible. Cependant, les éléments de structures secondaires sont particulièrement bien conservés entre la BPI et la PLTP [Huuskonen, 1999], notamment au niveau de la poche de fixation des lipides. La différence essentielle entre la PLTP et la LBP ou la BPI, réside en fait dans un ensemble de résidus situé à la pointe N-terminal de la structure en boomerang de ces 3 protéines : L'ensemble des résidus cationiques de la LBP et de la BPI est substitué par un ensemble de résidus aromatiques hydrophobes chez la PLTP [Desrumaux, 2001]. Or, tout comme les résidus cationiques interviennent dans la fixation des LPS par la LBP et la BPI [Lamping, 1996], les résidus aromatiques hydrophobes interviennent dans le transfert des molécules amphiphiles par la PLTP vers les lipoprotéines HDL en particulier [Desrumaux, 2001]. Outre ces interactions hydrophobes, il est notable à ce stade que Desrumaux C et coll. aient aussi démontré l'influence des interactions électrostatiques dans l'activité de transfert de la PLTP vers les lipoprotéines HDL [Desrumaux, 1998].

ii. Fonction

Initialement, la PLTP a été décrite comme une protéine transférant les phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides (CM, VLDL, IDL et LDL) vers les HDL et donc comme une protéine capable de modifier la composition, la structure, la taille et les propriétés biologiques des HDL [Jauhiainen, 1993 ; Huuskonen, 2001 ; Lagrost, 1998]. Ce rôle central dans le métabolisme des lipides fait de la PLTP un paramètre important dans de nombreux processus physiologiques, tels que le métabolisme cérébral [Desrumaux, 2005] ou la biologie de la reproduction [Masson, 2003], mais aussi dans certaines pathologies comme l'athérogenèse [Yang, 2003 ; Jiang, 2001].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

Mais plus étonnamment, la PLTP joue aussi un rôle clef dans la réponse immunitaire induite par les LPS [Hailman, 1996 ; Vesey, 2000] : en tant que membre de la famille génétique LT/LBP [Kirschning, 1997], la PLTP est capable de transférer non seulement des phospholipides mais aussi d'autres molécules amphiphiles (diacylglycerols [Rao, 1997], cholestérols non estérifiés [Jiang, 1999], tocophérols [Kostner, 1995 ; Desrumaux, 1999] et sphingomyélines [Rao, 1997 ; Jiang, 1999]) parmi lesquelles les LPS [Hailman, 1996 ; Vesey, 2000 ; Levels, 2005 ; Gautier, 2008]. En effet, alors que la PLTP est initialement considérée comme une protéine de transfert des phospholipides, la PLTP recombinante tout comme la LBP recombinante, sont capables *in vitro* de lier et de transférer les LPS vers des lipoprotéines [Hailman, 1996]. La seule différence étant que la PLTP recombinante n'intervient pas dans la détection cellulaire du LPS. Contrairement à la LBP [Pugin, 1993 ; Schumann, 1990 ; Wright, 1990], la PLTP recombinante est en effet incapable de transférer les LPS au CD14 [Hailman, 1996].

Ces conclusions de Hailman E et coll. sur la base de la comparaison fonctionnelle de la LBP et de la PLTP sont consolidées par Vesey CJ et coll., qui ont démontré *in vitro* :

- d'une part la capacité commune de la PLTP et de la LBP purifiées à libérer et transférer les LPS ancrés dans la membrane bactérienne Gram-négatif vers les lipoprotéines HDL [Vesey, 2000] ;
- d'autre part, l'incapacité de la PLTP purifiée à transférer les LPS ancrés dans la membrane bactérienne Gram-négatif vers le CD14, et ce contrairement à la LBP purifiée [Vesey, 2000].

In vivo, chez la souris injectée avec des LPS, une diminution de l'activité plasmatique de la PLTP résulte en un moindre taux de transfert des LPS vers les HDL, en une diminution de la clairance plasmatique des LPS et en une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires [Gautier, 2008]. En conséquence, on constate après injection de LPS, une augmentation significative de la mortalité chez les souris déficientes en PLTP par rapport aux souris de type sauvage [Gautier, 2008]. En outre, *ex vivo*, la protection des splénocytes contre l'inflammation et la cytotoxicité induites par les LPS est favorisée en présence de PLTP et de lipoprotéines [Gautier, 2008].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

Alors qu'en favorisant le transfert des LPS soit vers les lipoprotéines, soit vers le CD14, la LBP joue un double rôle paradoxal, anti-inflammatoire [Jack, 1997 ; Lamping, 1998] versus pro-inflammatoire [Gallay, 1993], la PLTP semble avoir un rôle anti-inflammatoire univoque dans l'endotoxémie [Gautier, 2008]. Ceci à l'exception près du cas du lipide A triacycle étudié par Gautier et coll : chez la souris injectée avec des lipides A triacycle, la présence de PLTP augmente le temps de résidence plasmatique du lipide A triacycle et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires [Gautier, 2010]. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est augmentée, car le temps de résidence plasmatique des lipides A triacycle associés aux lipoprotéines est supérieur à celui des lipides A triacycle libres. Gautier et coll. expliquent que ces observations différentes de celles faites avec des LPS, tiennent probablement aux propriétés physico-chimiques particulières des lipides A triacycle. En effet, étant donnée leur CAC élevée, ces molécules sous forme libre forment en milieu aqueux des complexes supramoléculaires de petites tailles, dont le passage au travers des fenestres endothéliales est aisé ; alors que leur clairance plasmatique sous leur forme associée aux lipoprotéines est beaucoup plus lente et a donc un effet pro-inflammatoire.

2. Inactivation des LPS par les lipoprotéines

La corrélation entre d'une part le transfert des LPS sur les lipoprotéines par la PLTP et d'autre part l'inactivation de l'activité biologique des LPS, n'est pas sans rappeler que depuis plusieurs décennies, le plasma est décrit comme contenant un élément inactivateur des LPS et ce indépendamment du système du complément et des anticorps [Luderitz, 1958 ; Skarnes, 1958]. Or, de nombreuses études montrent que les lipoprotéines par leur capacité à fixer les LPS [Freudenberg, 1980 ; Vreugdenhil, 2003], notamment par l'action de la LBP et de la PLTP, sont cet élément inactivateur des LPS. Cette inactivation des LPS par les lipoprotéines résulte de changements structuraux des LPS associés à ces dernières et impacte différents niveaux biologiques et physiopathologiques.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

a. Mécanismes moléculaires d'inactivation des LPS par les lipoprotéines

Les lipoprotéines et certains de leurs composants, comme l'apolipoprotéine A1 (apoA1), sont capables d'inactiver les LPS. La preuve nous en est donnée par Emancipator et coll., qui ont démontré qu'en présence de HDL ou d'apoA1, la capacité des LPS à activer le test LAL et leur capacité à induire la fièvre chez un lapin sont significativement diminuées [Emancipator, 1992].

Le pouvoir inactivateur des lipoprotéines est dépendant de leur classe d'appartenance et du type de LPS mis en jeu [Sprong, 2004]. Ainsi, les LDL et les HDL diminuent fortement les sécrétions d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-10, induites par les LPS issus de *Escherichia coli* ; alors que les VLDL ont un effet inactivateur bien moindre. De même, le type des LPS affecte le pouvoir inactivateur des lipoprotéines, de telle sorte que dans les mêmes conditions, les LPS de *Neisseria meningitidis* sont moins inactivés que ceux de *Escherichia coli*. La chaîne polysaccharidique des LPS n'est pas responsable de ces différences, suggérant que l'élément structurel déterminant le degré d'inactivation des LPS par les lipoprotéines est leur lipide A [Sprong, 2004]. Or, ce lipide A dont les groupements phosphates et le squelette diglucosamine sont les éléments fonctionnels de la liaison entre les LPS et les lipoprotéines, est en effet unanimement reconnu comme porteur de l'activité endotoxinique. L'importance du lipide A dans le mécanisme moléculaire d'inactivation des LPS par les lipoprotéines est appuyée par l'étude de Brandenburg et coll : la présence de HDL augmente la température de transition de phase cristal-liquide-gel des LPS et tend à rigidifier les chaînes acyles du lipide A. Au-delà des impacts structurels sur les LPS monomériques, la présence de HDL provoque aussi un changement d'architecture des complexes supramoléculaires de LPS. En présence de HDL, on observe en effet un passage des complexes supramoléculaires de LPS d'une organisation cubique inversé/unilamellaire à une organisation multilamellaire [Brandenburg, 2002]. Le pouvoir d'inactivation des lipoprotéines sur les LPS tient donc à leur capacité à induire des changements structurels tant à l'échelle des lipides A, que des complexes supramoléculaires de LPS. Ces changements structurels inactivateurs des LPS vont avoir des effets anti-inflammatoires à plusieurs niveaux du métabolisme des LPS.

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

b. Effets des lipoprotéines sur le métabolisme des LPS

i. Effet inhibiteur sur l'activation du système du complément

Les LPS associés aux lipoprotéines présentent une moindre capacité à activer le système du complément [Ulevitch, 1978]. Le système du complément étant moins activé, le recrutement, l'activation des cellules immunitaires et par conséquent la sécrétion de cytokines sont également amoindris. Néanmoins, l'activation du système du complément ne représente qu'une composante pro-inflammatoire mineure du métabolisme du LPS. L'essentiel des effets métaboliques de l'inactivation des LPS par les lipoprotéines tient donc à d'autres mécanismes, en l'occurrence ceux relatifs à l'immunité innée, à la biodistribution et à la clairance plasmatique des LPS.

ii. Effet inhibiteur sur l'activation des cellules de l'immunité innée

Les LPS associés aux lipoprotéines se lient moins à la surface des monocytes/macrophages que les LPS libres [Cavaillon, 1990]. Cette moindre fixation ne semble pas s'expliquer par un défaut d'affinité de la LBP, celle-ci étant capable de transférer les LPS associés aux HDL vers les LDL [Levels, 2005]. Le pouvoir inactivateur des lipoprotéines sur les LPS se répercute donc en une moindre interaction des LPS associés aux lipoprotéines avec la surface des monocytes/macrophages, donc avec les récepteurs de l'immunité innée TLR4 et finalement en une moindre activation des monocytes/macrophages.

Et cela d'autant plus, qu'il a été démontré *in vitro*, qu'en présence de sCD14 et LBP recombinante, les lipoprotéines HDL sont capables de récupérer les LPS déjà fixés à la surface des monocytes [Kitchens, 1999 ; Kitchens, 2001].

En résumé, deux phénomènes expliquent l'inhibition de l'activation des cellules de l'immunité innée :

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

- la faible fixation par les monocytes/macrophages, des LPS associés aux lipoprotéines ;
- le relargage des LPS déjà fixés aux monocytes/macrophages.

iii. Effet favorisant la clairance plasmatique des LPS

La fixation des LPS aux lipoprotéines aboutit à la formation de complexes dont les propriétés physico-chimiques dépendent de la classe des lipoprotéines et du type des LPS mis en jeu [Freudenberg, 1980]. Ainsi les complexes HDL-LPS impliquant des "*smooth-LPS*" présentent un temps de résidence plasmatique de 2 jours, alors que ceux composés de "*rough-LPS*" sont éliminés au bout de quelques heures [Freudenberg, 1980]. De même, il a été démontré par Mathison et Ulevitch, que suite à leur injection à un lapin, les LPS se retrouvaient sous deux formes dans le plasma : une forme de faible densité et une forme de forte densité que l'on peut respectivement identifier aux LPS libres et aux LPS associés aux lipoprotéines. Selon cette étude, la biodistribution et la cinétique d'élimination plasmatique de ces deux formes de LPS sont différentes [Mathison, 1979]. Ces résultats sont également confirmés par d'autres études ; ainsi il est établi que :

- les complexes lipoprotéines-LPS se retrouvent essentiellement au niveau des glandes surrénales et du foie, notamment dans les hépatocytes pour les complexes CM-LPS [Harris, 1993 ; Mathison, 1979] ; alors que les LPS libres se concentrent majoritairement dans les monocytes et macrophages des poumons, les macrophages de la rate et les vacuoles de phagocytose des cellules hépatiques de Kupffer [Mathison, 1979 ; Freudenberg, 1982] ;
- les complexes HDL-LPS et CM-LPS ont des temps de résidence plasmatique inférieurs aux LPS libres [Harris, 1993 ; Harris, 1998 ; Sewnath, 2000] ;
- l'excrétion biliaire des complexes CM-LPS est plus importante que celle des LPS libres [Read, 1993].

L'association des lipoprotéines et des LPS détermine donc la biodistribution et la clairance plasmatique de ces derniers. Les complexes lipoprotéines-LPS étant pris en

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

charge via les récepteurs des lipoprotéines [Mathison, 1979], cette différence de devenir peut s'expliquer au moins en partie par un différentiel de reconnaissance de ces complexes par ces récepteurs, notamment par les SR-BI en ce qui concerne les complexes HDL-LPS [Hampton, 1991-a].

En conclusion, l'association des LPS aux lipoprotéines diminue l'activation du système du complément, diminue l'activation de cellules de l'immunité innée et favorise la clairance plasmatique des LPS. Par leurs effets sur ces trois composantes du métabolisme des LPS, les lipoprotéines constituent donc de puissants agents inactivateurs des LPS.

c. Impacts des lipoprotéines sur les effets physiopathologiques induits par les LPS

i. Impact des lipoprotéines sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par les LPS

Flegel WA et coll. ont montré que des LPS pré-incubés avec du sérum humain induisent 100 fois moins la sécrétion d'IL-1 par des monocytes humains en culture par rapport aux LPS non incubés [Flegel, 1989]. Or, il suffit de dépler le sérum humain de pré-incubation pour que les LPS pré-incubés présentent le même pouvoir d'induction d'IL-1 que les LPS non incubés.

Les expériences de Cavaillon et coll. confirment ces résultats : comparés aux LPS libres, les LPS liés à des lipoprotéines sont 20 à 1000 fois moins actifs pour induire la sécrétion d'IL-1, d'IL-6, de TNF par des macrophages péritonéaux de souris et des monocytes humains en culture [Cavaillon, 1990].

In vitro, tous les types de lipoprotéines neutralisent dans les mêmes proportions, la sécrétion de cytokines induites par les LPS [Flegel, 1993 ; Recalde, 2004].

In vivo, comparé aux souris contrôles négatifs, les souris avec de fort taux de HDL circulantes présentent une concentration de TNF α sécrétée cinq fois moins importante après injection de LPS [Levine, 1993]. Chez les souris et chez les rats dont les taux de lipoprotéines ont été diminués par traitement pharmacologique, l'injection de LPS

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

provoque une sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ plus importante que chez le groupe contrôle [Feingold, 1995]. Ces résultats obtenus chez l'animal se vérifient chez l'Homme :

- les concentrations plasmatiques de $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 et IL-8 induites par l'injection de LPS sont plus faibles chez les patients ayant reçu préalablement une injection de lipoprotéines HDL reconstituées [Pajkrt, 1996] ;
- la concentration plasmatique de cholestérols HDL est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques d'IL-6 et de $\text{TNF}\alpha$ chez des sujets en sepsis [Chien, 2005] ;
- la concentration plasmatique de lipoprotéines HDL est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 chez des sujets injectés avec du LPS [Birjmohum, 2007].

Il est intéressant de noter que l'apoA1 semble être un élément déterminant dans la capacité à inactiver les lipoprotéines. En effet, les souris et les lapins recevant une injection d'apoA1 produisent moins d'IL-1, de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-6 et d'IL-1 β en réponse à une injection de LPS [Hubsch, 1993 ; Yan, 2006 ; Li, 2008]. Toutefois, ces résultats sont à nuancer eu égard à l'étude de Smoak et coll., qui montre que l'apoAI délipidée peut activer le facteur de transcription NF- κ B selon une voie de signalisation impliquant CD14, TLR2, TLR4 et MyD88 dans les macrophages ; NF- κ B activant finalement la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires [Smoak, 2010].

ii. Impact des lipoprotéines sur les symptômes induits par les LPS

Dès 1966, la liaison entre les lipoprotéines et les LPS est décrite par Rudbach et coll. comme altérant la pyrogénicité de ces derniers chez le lapin [Rudbach, 1966-b]. Cette diminution du pouvoir pyrogène des LPS a été confirmée et déterminée comme étant réversible [Ulevitch, 1978 ; Rudbach, 1966 ; Rudbach, 1966-a]. Cette réversibilité prouve que la structure des LPS n'est pas altérée par leur liaison aux lipoprotéines. Ceci est confirmé par Munford et coll. et Ulevitch et Johnston : il n'y a pas de différence

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

structurale entre les LPS purifiés et les LPS associés aux lipoprotéines [Munford, 1981 ; Ulevitch et Johnston, 1978].

Chez l'Homme, l'intensité des symptômes (myalgies, migraines, nausées, frissons, vomissements et coagulations) lors du choc endotoxinique est inversement corrélée à la concentration plasmatique des lipoprotéines HDL, mais est indépendante de celle des lipoprotéines LDL [Birjmohum, 2007].

iii. Impact des lipoprotéines sur la mortalité induite par les LPS

Chez l'animal, l'injection de LPS aboutit à une mortalité moindre si les LPS sont associés à l'un ou l'autre type de lipoprotéines (CM, VLDL, LDL ou HDL) [Harris, 1990 ; Harris, 1993 ; Read, 1993 ; Van Oosten, 2001 ; Berbée, 2005].

Chez la souris avec une concentration plasmatique de lipoprotéines HDL augmentée par l'injection de lipoprotéines HDL exogènes ou par transgénèse du gène de l'apoA1 humaine, on observe une meilleure survie suite à l'endotoxémie [Levine, 1993].

Chez le rat, la déplétion des lipoprotéines plasmatiques par traitement pharmacologique aboutit à une diminution du taux de survie à l'endotoxémie [Feingold, 1995].

Enfin, il est remarquable que la concentration plasmatique en apoA1 soit corrélée négativement à la mortalité à 30 jours chez des sujets en sepsis [Barlage, 2009].

3. Détoxification et élimination des LPS par la fonction hépato-biliaire

Chez les rats et les lapins, une quantité conséquente du LPS injectée en intraveineuse se retrouve rapidement dans le foie, notamment au niveau des cellules de Kupffer [Carey, 1958 ; Freudenberg, 1982 ; Musson, 1978 ; Mathison, 1979], puis dans les hépatocytes [Freudenberg, 1985-b ; Ge, 1994], avant de se retrouver dans la bile [Mimura, 1995]. D'après Mimura Y. et coll. la cinétique de sécrétion biliaire des LPS étant semblable à celle de substances connues pour être transportées directement dans la bile sans passer par le compartiment lysosomal des hépatocytes, il en est de même pour les LPS. Par ailleurs, la colchicine étant connue pour inhiber l'action des microtubules et pour

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

réduire l'excrétion biliaire des LPS, Mimura propose que le cheminement des LPS de la membrane sinusoïdale aux canalicules biliaires se fasse par un transport vésiculaire dépendant des microtubules. Le dysfonctionnement de l'excrétion biliaire observé durant l'endotoxémie [Hoffmann, 1999 ; Zhao, 2002] est probablement l'un des facteurs aggravants de la maladie. L'assimilation hépatique et l'élimination biliaire jouent donc un rôle essentiel dans le métabolisme des LPS.

L'assimilation hépatique des LPS est suivie d'une détoxification dont les mécanismes sont encore mal connus. Une action enzymatique et une action détergente constitueraient les deux leviers de la détoxification des LPS lors de l'endotoxémie :

- Il semble qu'une déacylation des LPS se produise dans le foie pour neutraliser l'activité biologique des LPS [Coulthard, 1996 ; Freudenberg, 1985-a ; Fox, 1988 ; Fukuda, 1989]. Toutefois, la pertinence physiologique de cette étape dans le métabolisme des LPS est mal définie ;
- Il est également connu que l'action *in vitro* sur le LPS, d'un acide biliaire tel que le désoxycholate, aboutit à la formation réversible de petits complexes supramoléculaires atoxiques [Rudbach, 1966 ; Bertók, 2004]. On peut donc supposer que le désoxycholate de sodium, comme d'autres acides biliaires, joue un rôle important dans la détoxification des LPS. Bertók propose d'ailleurs de considérer l'existence d'un mécanisme de "défense physico-chimique de l'organisme" dont le pouvoir de détoxification des LPS serait basé sur l'action détergente des acides biliaires [Bertók, 1977 ; Bertók, 1998-a ; Bertók, 2002]. Ce mécanisme permettrait de détoxifier les LPS, tout en conservant leur capacité à induire une résistance naturelle aux endotoxines [Bertók, 2002 ; Bertók, 1998-b].

Outre ces actions enzymatiques et détergentes, il est intéressant de noter que le foie filtre en permanence les LPS internalisés au niveau du tractus gastro-intestinal [Jacob, 1977 ; Lumsden, 1988]. Cette prise en charge physiologique des LPS par le foie n'entraîne pas de réaction inflammatoire grâce à la sécrétion rapide de molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 [Knolle, 2000 ; Knolle, 1997].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

III. Interactions entre le transport inverse du cholestérol et le transport inverse du LPS

1. Effets de l'endotoxémie sur les transporteurs

Suite à sa fixation à SR-BI/CLA-1, le LPS est internalisé par la cellule [Vishnyakova, 2003], alors qu'ABCA1 et ABCG1, quant à eux, participent autant à l'efflux du cholestérol que des LPS, à l'extérieur des macrophages [Gautier, 2011]. Or, la présence de LPS inhibe l'expression de ABCG1 [Khovidhunkit, 2003] et celle de ABCA1 [Yin, 2010 ; Castrillo, 2003 ; Khovidhunkit, 2003]. Toutefois, en ce qui concerne ce dernier, certaines études le décrivent comme activé en présence de LPS [Malik, 2011 ; Kaplan, 2002]. Globalement, l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires ont été rapportées comme inhibant l'expression de ABCA1 [Yin, 2010 ; Khovidhunkit, 2004], à l'exception du TNF α et de l'IL-6, qui ont été décrites comme activant son expression [Frisdal, 2011 ; Gerbod-Giannone, 2006].

2. Effets de l'endotoxémie sur l'assimilation cellulaire du cholestérol

La réponse inflammatoire favorise l'assimilation du cholestérol par les macrophages [Khovidhunkit, 2004]. Durant l'inflammation, on observe également une augmentation de l'assimilation du cholestérol par les glandes surrénales, ce qui favorise la synthèse de glucocorticoïdes [Tietge, 2003].

3. Effets de l'endotoxémie sur les lipoprotéines HDL

Les lipoprotéines HDL sont la cible de nombreux agents de la réponse inflammatoire. Ces agents modifient les caractéristiques physiologiques des lipoprotéines HDL, ce qui peut compromettre leur fonction dans le transport inverse du cholestérol, ainsi que leur pouvoir anti-inflammatoire. Par exemple, les "Sérum Amyloïde A" (SAA) sont d'importantes protéines de la réponse inflammatoire, surexprimées dans le foie durant celle-ci. Ces protéines exercent de nombreux effets sur les lipoprotéines HDL. Il semble

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

que les SAA réduisent le transport inverse du cholestérol [Annema, 2010], augmentent l'assimilation du cholestérol par les macrophages et diminuent son assimilation par les hépatocytes [Khovidhunkit, 2003].

On peut également citer la PhosphoLipase A2 sécrétée (sPLA2), qui est une protéine surexprimée durant l'endotoxémie et associées à la fraction HDL. Cette surexpression de la sPLA2 génère des HDL de plus petites tailles dont les teneurs en protéines et en triglycérides sont augmentées et celles en esters de cholestérols et en phospholipides sont diminuées. Or, cette diminution de la taille des HDL contribue à l'augmentation du catabolisme des HDL, indépendamment des SAA. Ceci résulte en une diminution des taux plasmatiques de HDL et de son composant protéique majoritaire, l'apoA1, durant l'endotoxémie [Tietge, 2000 ; Tietge, 2002].

Cette surexpression de sPLA2 est aussi accompagnée d'une augmentation de l'assimilation hépatique du cholestérol-HDL via les récepteurs SR-BI. L'expression hépatique de SR-BI restant inchangée, cette augmentation de l'assimilation hépatique du cholestérol-HDL est le résultat de la modification de composition des HDL [Tietge, 2008].

4. Effets de l'endotoxémie sur le métabolisme hépatique du cholestérol

Durant l'endotoxémie, le transit du cholestérol du foie aux voies biliaires est ralenti. Comme l'ont montré McGillicuddy F.C. et coll., l'injection *in vivo* de LPS réduit le transport inverse du cholestérol en inhibant l'expression des transporteurs ABCG5, ABCG8, ABCG11, ainsi que celle du cytochrome CYP7A1 [McGillicuddy, 2009]. Annema et coll. confirment ces résultats quant à la diminution de l'expression hépatique des transporteurs ABCG5, ABCG8 et ABCG11, après l'injection de LPS ; alors qu'ils observent la réduction de l'expression hépatique du cytochrome CYP27A1, et non celle du cytochrome CYP7A1 [Annema, 2010].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

5. Effets du transport inverse du cholestérol sur la réponse inflammatoire

a. Effets directs du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol et sa composante liée au transport inverse du cholestérol module l'immunité innée à différents niveaux :

- il a été démontré que l'assimilation du cholestérol libre par les membranes des macrophages est capable d'activer les TLR, notamment le TLR4 [Sun, 2009] ;
- il est remarquable que l'assimilation du cholestérol induise une réponse pro-inflammatoire des cellules par une voie de signalisation indépendante des TLR, cette voie aboutissant à la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-6 [Li, 2005], d'IL-1 β et d'IL-18 [Duewell, 2010]. Ce mécanisme d'induction de l'inflammation par le cholestérol pourrait impliquer la stimulation de l'inflammasome NLRP3 (NALP3 ou cryopyrine) activant la caspase-1 et aboutissant à la sécrétion d'IL-1 [Duewell, 2010].

b. Effets indirects du cholestérol par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs nucléaires LXR

Les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont activés par les oxystérols. D'une part, cette activation favorise le transport inverse du cholestérol, entre autres par l'augmentation de l'expression des récepteurs ABCA1 et ABCG1 [Calkin, 2010]. D'autre part, cette activation aboutit à d'importants effets anti-inflammatoires. Ce double effet de l'activation des récepteurs nucléaires LXR α et LXR β leur confère un rôle central dans l'interaction entre le métabolisme des lipides et l'immunité innée.

Lors de la stimulation des cellules par le LPS et les bactéries, l'activation des récepteurs nucléaires LXR inhibe les gènes pro-inflammatoires [Joseph, 2003].

In vivo, l'activation de ces récepteurs atténue les effets biologiques de l'inhalation de LPS par des souris, entraînant notamment une diminution de l'inflammation dans les poumons [Smoak, 2008]. Cet effet anti-inflammatoire des récepteurs nucléaires LXR se produit :

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

- d'une part en favorisant la déplétion en cholestérol des radeaux lipidiques des membranes cellulaires par stimulation des transporteurs ABC. Ceci altère les voies de signalisation intracellulaire [Pommier, 2010].
- d'autre part via la SUMOylation de LXR qui induit le recrutement d'un complexe de co-répression au niveau du promoteur de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation [Ghisletti, 2009 ; Ghisletti, 2007].

Les effets anti-inflammatoires de ces récepteurs nucléaires doivent cependant être nuancés, puisque l'une des cibles positivement régulées par LXR chez l'homme est le gène de TLR4. Ainsi, si un traitement à court terme des macrophages humains, avec des agonistes LXR ou des LDL oxydées, aboutit bien à une diminution de la réponse inflammatoire ; une activation de LXR à long terme, en augmentant le nombre de récepteurs TLR4, exacerbe la réponse de ces cellules aux LPS [Fontaine, 2007]. Les récepteurs nucléaires LXR ont donc également un effet pro-inflammatoire. Ainsi, la culture de cellules dendritiques humaines en présence de LPS et de ligands des récepteurs nucléaires LXR, aboutit à une activation prolongée de NF- κ B et à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires [Torocsik, 2010].

Réciproquement, il est intéressant de noter que le LPS induit lui-même la synthèse cellulaire des oxystérols, ligands des récepteurs nucléaires de LXR [Bauman, 2009].

c. Effets de SR-BI, de la CETP et de la PLTP sur la réponse inflammatoire

Les souris déficientes en SR-BI présentent un défaut de clairance hépatique des lipoprotéines HDL liés au LPS. De plus, les macrophages de souris déficientes en SR-BI sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires suite à un traitement aux LPS. Enfin, ces souris présentent aussi un défaut de distribution du cholestérol aux glandes surrénales, ce qui aboutit à une altération de la synthèse des glucocorticoïdes durant le sepsis. L'ensemble de ces lacunes liées à l'absence de SR-BI, est responsable d'une inflammation et d'une létalité plus forte chez ces souris durant le sepsis [Cai, 2008]. Inversement, des souris transgéniques surexprimant SR-BI sont plus résistantes au sepsis. L'ensemble de ces

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

résultats montre que le récepteur SR-BI possède un effet protecteur anti-inflammatoire via plusieurs mécanismes :

- son rôle clé dans le transport inverse du LPS en tant que récepteur hépatique ;
- un effet anti-inflammatoire direct sur les macrophages ;
- son implication dans le captage de cholestérol nécessaire à la synthèse de glucocorticoïdes protecteurs.

Les souris exprimant la CETP humaine présentent une augmentation du transport inverse du cholestérol en offrant une voie alternative de retour du cholestérol au foie via les lipoprotéines à apoB [Yamashita, 2001]. Ces souris montrent aussi une meilleure prise en charge des LPS circulants par le foie, ainsi qu'un meilleur taux de survie durant l'endotoxémie [Cazita, 2008]. Néanmoins, le mécanisme exact impliqué dans l'effet protecteur de la CETP n'a pas été élucidé. En effet, la CETP ne semble pas avoir la capacité d'interagir directement avec les LPS [Clark, 2010]. La CETP pourrait donc avoir un effet indirect par son implication dans le métabolisme des HDL.

En comparaison aux souris exprimant la CETP humaine [Cazita, 2008], les effets observés chez des souris déficientes en PLTP durant l'endotoxémie, sont diamétralement opposés :

- diminution de la clairance des LPS ;
- augmentation du pouvoir pro-inflammatoire des LPS ;
- augmentation du taux de mortalité [Gautier, 2011-b].

Durant l'endotoxémie, le temps de résidence plasmatique du LPS et la quantité plasmatique de cytokines pro-inflammatoires sont augmentés chez les souris homozygotes déficientes en PLTP en comparaison aux souris de type sauvage [Gautier, 2008 ; Gautier, 2010]. En outre, en comparaison aux souris de type sauvage, les souris homozygotes déficientes en PLTP présentent des dommages organiques et cellulaires plus importants, entraînant une mortalité plus élevée [Gautier, 2008].

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

En conclusion, les protéines clefs de la régulation du transport inverse du cholestérol influent significativement sur l'élimination du LPS et sur les effets physiopathologiques de l'endotoxémie.

d. Effets des lipoprotéines HDL sur la réponse inflammatoire

Les lipoprotéines HDL sont capables de fixer et de neutraliser les LPS comme le démontrent plusieurs études [Kitchens, 1999 ; Khovidhunkit, 2004]. Les phospholipides comme les apolipoprotéines contribuent à ce pouvoir de neutralisation des LPS par les HDL [Khovidhunkit, 2004]. Il a également été démontré que les lipoprotéines HDL ont un rôle encore plus vaste dans l'immunité innée. En effet, elles sont capables de lier et de neutraliser des virus, ainsi que de lutter contre des parasitoses [Khovidhunkit, 2004].

Si les HDL en tant que particules semblent clairement exercer un effet anti-inflammatoire, l'apoAI, constituant majeur des HDL, exerce en revanche des effets plus nuancés en tant que protéine isolée. L'apoAI a certes un effet anti-inflammatoire sur des macrophages traités avec du LPS. Cet effet est au moins partiellement le fait de plusieurs mécanismes impliquant les transporteurs ABCA1, qui [Tang, 2009-b] :

- favorisent l'efflux de cholestérol depuis les rafts, perturbant ainsi la transduction du signal à partir des récepteurs TLR4 ;
- activent des protéines JAK2 puis STAT3 grâce à leur activité ATPase, indépendamment de leur fonction d'efflux ; STAT3 inhibant la transcription de nombreux gènes cibles de NF- κ B.

Inversement, l'apoAI délipidée est capable, contrairement aux lipoprotéines HDL, d'activer le facteur de transcription NF- κ B via une voie impliquant CD14, TLR2, TLR4 et MyD88, et donc de déclencher la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [Smoak, 2010]. Il est intéressant de noter que de manière réciproque la protéine MyD88, qui joue le rôle d'adaptateur du TLR, joue un rôle dans l'efflux de cholestérol chez les macrophages *in vitro* et dans le transport inverse du cholestérol *in vivo*

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

[Smoak, 2010]. Il est probable que la protéine MyD88 est un intermédiaire dans la voie de signalisation qui régule l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages.

IV. Utilisation de LPS marqués pour étudier le transport inverse du LPS

Comme pour toute molécule biologique, il existe plusieurs modalités de marquage des LPS. Chacun de ces types de marquage a ses indications propres.

1. Marquage fluorescent pour une détection des LPS par microscopie optique

Les LPS marqués par des fluorochromes sont disponibles dans le commerce [Triantafilou, 2000 ; Troelstra, 1997 ; Trubetskoy, 1990]. Il existe de nombreux fluorochromes associés aux LPS. Toutefois, leur utilité se réduit à l'observation statique par microscopie optique de cellules ou de coupes d'organe ayant intégré les LPS fluorescents, dans ce dernier cas, après sacrifice de l'animal injecté avec les LPS marqués.

La présence de nombreux éléments fluorescents dans le plasma sanguin [Lualdi, 2007 ; Graaff, 2014] constitue un bruit de fond, qui empêche l'utilisation de la fluorescence en spectrofluorimétrie pour le suivi dynamique du LPS plasmatique.

2. Marquage radioactif pour une détection des LPS par scintigraphie

Il est également possible de radiomarquer les LPS comme le rapportent plusieurs études [Kleine, 1985 ; Munford, 1992], notamment en cultivant des bactéries Gram-négatif dans un milieu nutritif supplémenté en radionucléides ou par traitement chimique par l'ion pertechnétate (TcO_4^-) selon la méthode d'Hamilton et Walker [Hamilton, 1978 ; Rosenbaum, 1983]. L'utilisation de ce genre de marquage permet de suivre en temps réel le cheminement des LPS tout au long de leur circulation dans le compartiment vasculaire, ainsi que dans les différents organes. Les principales contraintes de cette approche centrée sur l'utilisation de radionucléides comme marqueurs, résident dans la nécessité d'un

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

équipement de scintigraphie, et évidemment dans la prise des précautions propres à l'utilisation de la radioactivité.

La scintigraphie se fonde sur la détection par une gammacamera (cristal scintillateur convertissant la radioactivité gamma en signal lumineux) du rayonnement gamma émis par les radionucléides [Genna, 1981].

La principale limite de la scintigraphie consiste en l'imprécision de la gammacamera pour localiser la position de l'émetteur radioactif dans le tissu, car les photons gamma sont émis dans toutes les directions par la source radioactive. En outre, la direction et l'énergie du photon gamma sont susceptibles d'être modifiées par sa collision avec la matière biologique. Cette modification des propriétés du photon suite à une collision est nommée effet Compton. Il résulte de ces deux phénomènes que la scintigraphie a une mauvaise résolution.

3. Développement d'un LPS marqué par un agent bimodal fluorescent/radioactif à demi-vie courte pour une détection par Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP)

La TEMP (ou *Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) fonctionne selon le principe de la scintigraphie, à la différence près qu'elle permet la production d'une image en 3 dimensions grâce [Jaszczak, 1985 ; Gullberg, 2010] :

- d'une part à l'acquisition du signal radioactif via un ou plusieurs capteurs qui tournent autour du sujet de l'expérience ;
- d'autre part au traitement informatique du signal mesuré.

La TEMP a une bonne sensibilité et peut être utilisée avec de nombreux radioisotopes. Toutefois, elle est aussi limitée par sa faible résolution (8-12 mm).

Par ailleurs, visant l'utilisation de la TEMP, un LPS marqué par un agent bimodal présentant à la fois une fluorescence et la capacité de se complexer avec l'indium 111 (In^{111}), un radioisotope de demi-vie courte (2,3 jours), a été développé lors d'une

Etude bibliographique

D. Transport inverse du cholestérol et du LPS

collaboration entre mon équipe de recherche Inserm et une équipe de recherche CNRS, dans le cadre du projet 3MIM (GIS Pharmimage) [*cf.* article n°3 : Duhéron, 2013].

Suite à une seule et même injection chez un même animal, ce nouveau type de LPS marqués permet :

- de suivre à l'échelle des organes le métabolisme des LPS en temps réel grâce à la radioactivité mesurée par TEMP ;
- d'approfondir l'étude de ce métabolisme des LPS à l'échelle cellulaire en collectant les différents organes d'intérêt, afin de les observer en microscopie confocale à fluorescence.

D'ailleurs cette technique a permis à Duhéron et coll. de confirmer par visualisation en temps réel, le transport inverse du LPS avec accumulation de celui-ci dans les cellules hépatique [*cf.* article n°3 : Duhéron, 2013].

V. Conclusion

Le métabolisme des lipides et l'immunité innée apparaissent donc comme deux systèmes se chevauchant en de nombreux points. Le transport inverse du cholestérol constitue la plus remarquable de ces interfaces entre les deux systèmes. Cette voie partage ses acteurs biologiques et physiologiques (transporteurs, enzymes, récepteurs, cellules, organes...etc.) avec le transport inverse du LPS dont les fonctions d'inactivation, de transport, de détoxification et d'élimination des LPS font de lui une voie à part entière de l'immunité innée.

RECHERCHE
&
DEVELOPPEMENT

A. Présentation des travaux de Recherche et de Développement**I. Problématiques et stratégies**

Le LPS est une molécule ancestrale participant à la composition de l'enveloppe des bactéries Gram-négatif. Sa nature amphiphile est le résultat de sa structure chimique constituée schématiquement d'une chaîne polysaccharidique liée de façon covalente à une région lipidique, nommée lipide A. Le LPS étant synthétisé et transporté par les bactéries, il se trouve être très abondant dans notre environnement, avec une grande diversité de structures, sujettes à une importante variabilité, même au sein d'une même bactérie. L'existence de la flore commensale fait du LPS l'une des molécules organiques les plus représentées chez l'Homme. D'autre part, d'un point de vue qualitatif, la double nature du LPS, lipidique et osidique, en fait un agent capable d'interagir avec de nombreuses voies métaboliques, notamment celles du système immunitaire inné et celles du métabolisme des lipides.

Les effets biologiques des LPS sont remarquablement puissants, conférant à ces molécules un rôle central dans de nombreuses maladies : sepsis, athérosclérose, diabète, obésité. En recherche, le LPS est principalement utilisé pour induire et étudier l'endotoxémie comme la composante inflammatoire essentielle de ces pathologies. Il est donc intéressant de se questionner sur le modèle de l'endotoxémie induite par internalisation des LPS, notamment sur le lien entre la structure du LPS et ses effets physiopathologiques. En effet, une meilleure compréhension de cette relation permettrait dans un objectif ultime de mieux prédire et de mieux soigner les pathologies impliquant les LPS, notamment le sepsis dans sa phase la plus aigüe : le choc septique, qui par sa fulgurance et l'absence de thérapie efficace a souvent une issue fatale.

Voici plus d'un siècle que le LPS est étudié. Pourtant, de par ses oppositions, la littérature disponible sur le sujet donne l'impression d'une mauvaise connaissance de cette molécule et de ses effets : Souvent considéré comme un monomère amphiphile dont l'activité biologique tient exclusivement à la structure de son lipide A, plus rarement envisagé sous l'angle des complexes supramoléculaires qu'il forme en solution aqueuse. Tantôt présentés comme des toxines, parfois décrits comme des agents thérapeutiques,

nous pourrions penser que tout et son contraire a été dit à propos des LPS. La grande diversité de ces molécules, leur intense variabilité structurale, ainsi que leur nature duelle participent probablement à cette impression de confusion. Cette complexité physico-chimique des LPS explique aussi probablement l'absence de techniques de dosage et de traçage, qui soient à la fois ergonomiques, universelles et performantes pour étudier *in vitro* et *in vivo* ces molécules.

Le but de mon travail a donc été de développer des outils de dosage et de traçage des LPS répondant à ces critères et d'étudier les relations qu'il existe entre les propriétés structurales, biologiques et métaboliques du LPS, au travers de trois problématiques complémentaires ; la résolution de chacune ayant abouti à la rédaction d'un article technique ou scientifique :

1. Problématique n°1 : Comment doser les LPS avec performance et indépendamment de leur variabilité structurale ?

La comparaison des effets biologiques et le suivi du devenir métabolique de LPS présentant des structures variables, et donc de poids moléculaires différents, nécessite de contrôler les quantités molaires des composés utilisés. Par conséquent, j'ai contribué au développement et à la mise en œuvre d'une technique de dosage qui ne soit sensible ni à la conformation spatiale du lipide A, ni au comportement d'agrégation du LPS. En effet, ces deux aspects sont susceptibles de différer entre les chémotypes de LPS, invalidant l'utilisation des tests commerciaux tel que le dosage LAL, dont la sensibilité à ces variations est avérée. Ces travaux ont été menés en collaboration entre notre équipe et la plateforme lipidomique de l'Institut Fédératif de Recherche 100 Santé STIC.

Pour résoudre cette problématique nous sommes partis du constat que l'acide 3-hydroxymyristique est un composé commun de très nombreux LPS et donc un bon marqueur de ces derniers. Pour exploiter ce dénominateur commun des LPS, j'ai contribué au développement d'un protocole de quantification de l'acide 3-hydroxymyristique par LC-MS/MS, qui nous a permis de mettre les hautes performances de cette technologie avancée de spectrométrie de masse au service du dosage des LPS.

2. Problématique n°2 : Comment prédire plus précisément l'endotoxicité des LPS à partir de leurs structures ?

En partant de l'hypothèse d'une relation structure-agrégabilité-endotoxicité considérant aussi la structure de la chaîne polysaccharidique et non plus celle du seul lipide A, j'ai comparé à concentration équimolaire deux chémotypes différents de LPS extraits de la souche bactérienne *Salmonella enterica* serovar *minnesota*. Les deux chémotypes de LPS en question présentent des lipides A de structures identiques, mais des longueurs de chaînes polysaccharidiques différentes. Ainsi, j'ai pu moduler le comportement physico-chimique de ces molécules, tout en conservant intactes et communes les structures de la partie lipide A, et donc leur potentiel biologique. Le lipide A est en effet la région lipidique du LPS, considérée unanimement comme la responsable de son activité biologique. Sur la base d'une étude physico-chimique de ces LPS et d'une étude *in vivo* de l'endotoxémie induite par ces derniers, j'ai déterminé l'influence de la chaîne polysaccharidique sur les propriétés physiques des agrégats de LPS, leurs métabolismes et leurs effets pro-inflammatoires.

3. Problématique n°3 : Comment tracer en temps réel les LPS durant leur métabolisme et après sacrifice de l'animal ?

D'une part, l'imagerie par scintigraphie présente un avantage reconnu pour les observations en temps réel à l'échelle de l'organisme entier, ainsi qu'une sensibilité élevée. D'autre part, l'imagerie par fluorescence est une indication ergonomique de premier choix pour l'observation cellulaire et subcellulaire post-sacrifice des animaux de laboratoire. Ces deux approches répondant aux deux exigences temporelles de notre problématique avec une complémentarité en termes d'échelle d'observation et de sensibilité, nous avons décidé de développer une technique de marquage bimodal (fluorescence+radioactivité) du LPS. J'ai contribué à ces travaux au travers de la mise au point du test *in vitro* de validation de l'activité biologique des LPS marqués. Ce marquage bimodal du LPS constitue un moyen innovant et avantageux pour suivre avec une grande sensibilité le métabolisme de tout type de LPS, à la fois en temps réel et après sacrifice de l'animal.

B. Les travaux de Recherche et de Développement**I. Article n°1 : Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus ameocyte lysate assay**

Fiche introductive	<p>Introduction</p> <p>Le dosage du LPS est utile dans de nombreux types de recherche (caractérisation du LPS, inflammation induite par le LPS, analyse d'infections à bactéries Gram-négatif, évaluation de la sévérité de sepsis...etc.). Or, les techniques de dosages actuellement disponibles (LAL, EndoLISA, HEK-Blue, GCMS...etc.) présentent de nombreux inconvénients.</p>
	<p>Développer une technique de dosage du LPS optimisée et d'évaluation <i>in vivo</i> du niveau d'inactivation du LPS</p>
	<p>Méthodologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Choix de la technologie LC-MS/MS, optimisation de l'étape d'hydrolyse, de l'étape d'extraction, de l'étape de séparation chromatographique et de l'étape d'analyse spectrométrique. - Comparaison avec les techniques standards de dosage du LPS. - Utilisation de sérum physiologique, d'intralipide ou de plasma murins/humains supplémentés en LPS. - Utilisation d'échantillons de plasma murins provenant de souris injectées avec du LPS, et d'échantillons de plasma humains provenant de patients présentant ou pas un SIRS infectieux, et un test LAL négatif.
	<p>Résultats</p> <p>La technique de dosage par LC-MS/MS est capable de détecter et quantifier un composant remarquable des LPS, l'acide 3-hydroxymyristique. La quantification de cette molécule est possible dès 40 ng/ml, tandis que sa détection peut se faire dès 12 ng/ml. La capacité intrinsèque du plasma à inactiver les LPS, notamment par leur transfert aux HDL par la PLTP, est confirmée chez des patients. De plus, une méthode inédite combinant test LAL et dosage par LC-MS/MS permet dorénavant de caractériser ce pouvoir d'inactivation par un ratio.</p>
	<p>Conclusion</p> <p>Contrairement au LAL, qui mesure l'activité du LPS, la technique de dosage du LPS par LC-MS/MS est quantitative. Elle est également fiable, pratique, précise, reproductible, sensible et spécifique du LPS qu'il soit actif ou inactivé. La détermination du pouvoir d'inactivation de l'organisme hôte par la combinaison de ces deux approches pourrait donc être utilisée en clinique pour identifier les patients présentant un risque élevé de choc endotoxique.</p>

Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus amebocyte lysate assay

By

Jean-Paul Pais de Barros^{a,b}, Thomas Gautier^{a,b}, Wahib Sali^{a,b}, Christophe Adrie^c, Hélène Choubley^b, Emilie Charron^b, Caroline Lalande^b, Naig Le Guern^{a,b}, Valérie Deckert^{a,b}, Mehran Monchi^d, Jean-Pierre Quenot^{a,b,e}, and Laurent Lagrost^{a,b,f}

^aINSERM Research Center UMR866, Université de Bourgogne, Dijon, France

^bLipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

^cPhysiology department, Paris University, Cochin Hospital, Paris, France

^dIntensive Care Unit, Jacques Cartier Hospital, Massy-Palaiseau, France

^eIntensive Care Unit, University Hospital of Dijon, Dijon, France

^fClinical research department, University Hospital of Dijon, Dijon, France

Running head: LPS quantitation by LCMS2 and its combination with LAL

Key words: lipopolysaccharides, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, limulus amebocyte lysate assay, systemic inflammatory response syndrome, sepsis, human, mouse

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; LCMS2, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; HPLC, high pressure liquid chromatography; LAL, limulus amebocyte lysate; GCMS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; PLTP, phospholipid transfer protein; BSTFA, N,O-Bis(trimethylSilyl)TriFluoroAcetamide; TMCS, TriMethyl-ChloroSilane; RT,

retention time; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; SOFA, sequential organ failure assessment.

Address correspondence to :

Laurent Lagrost or Jean-Paul Pais de Barros, Centre de Recherche Inserm/uB UMR866 “Lipids, Nutrition, Cancer” and LipSTIC LabEx, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d’Arc, BP87900, 21079 Dijon cedex, France. E-mail: laurent.lagrost@u-bourgogne.fr; jppais@u-bourgogne.fr

Abstract

Background: Quantitation of plasma lipopolysaccharides (LPS) might be useful to document Gram(-) bacterial infection, and to evaluate the severity of sepsis in patients. In the present work, high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LCMS2) was used to quantitate LPS in plasma samples.

Methods: Hydrolysed 3-hydroxymyristic acid was extracted with an organic solvent, separated by reversed phase HPLC and analysed by MS/MS in a triple quadrupole mass spectrometer. The direct LCMS2 quantitative assay was combined with the limulus amoebocyte lysate (LAL) bioassay to monitor neutralisation of LPS activity in biological samples.

Results: The described LCMS2 method is a reliable, practical, accurate, reproducible, and sensitive tool to quantitate LPS within the wide range of LPS concentrations that can be encountered in in vitro experiments, in animal studies and in human populations. The combination of the LAL and LCMS2 analyses in the present study provided new evidence of the intrinsic capacity of plasma to neutralize the activity of LPS. In a subset of patients with SIRS, with documented infection but with a negative plasma LAL test, significant amounts of 3-hydroxymyristate were measured by the LCMS2 method, and patients with the highest plasma LPS concentration were more severely ill.

Conclusions: LCMS2 is a relevant method to quantitate endotoxin in a sample, to assess the efficacy of LPS neutralization, and to evaluate the proinflammatory potential of LPS molecules *in vivo*. Routine LCMS2 measurement of endotoxemia might be used in clinical practice to identify SIRS patients with poor prognosis.

Introduction

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is defined by a cluster of clinical signs that include tachycardia, leukocytosis, tachypnoea, and pyrexia (1). Although SIRS is a major consequence of sepsis (*i.e.* a deleterious, non-resolving inflammatory response to infection that can lead to multiple organ dysfunction and septic shock), it can be caused by many pathological events that are not associated with the bacterial infection (1). It is of major importance to distinguish between non-infectious SIRS, sepsis and septic shock in critically ill patients because these groups of patients are markedly different in terms of care and clinical outcome. Positive microbiological identification tests (using conventional microbiological tests or bacterium DNA detection (2) as well as a number of inflammatory and infectious biomarkers (including cytokines, procalcitonin, immune cell markers or a combination of these) (3) have been proposed, but at this stage none has proved to be reliable enough to ascertain the occurrence and extent of infection in high-risk patients with SIRS. Interestingly, and as documented further by our group in the prospective multicentre cohort EPISS study (4), Gram-negative bacilli are the most frequently identified pathogens in patients with septic shock. In this context, the direct quantitation of the culprit component of the Gram negative bacterium (*i.e.* lipopolysaccharide (LPS) that triggers SIRS by interacting with the CD14/TLR4/MD2 receptor complex at the surface of leukocytes (1)) may be of high biological and clinical value. Because up to 100,000 molecules of LPS are known to locate at the surface of one single Gram(-) bacterium (1), LPS should provide an optimal and amplified signal to document bacterial infection *in vivo*.

Whereas plasma LPS concentration might be particularly relevant to document Gram(-) bacterial infection, it is still a major challenge to distinguish between SIRS patients with or without infection and to evaluate the severity of sepsis by performing LPS quantitation in body fluids and tissues. Previously described assays include biological activity assays (such as *limulus amebocyte lysate* (LAL) and LAL-like activity assays), fluorescence assays (such as EndoLISA, Pyrogene, or EndoZyme), enzymatic tests (such as HEK-Blue LPS detection kit) and mass assays (such as 3-hydroxymyristate quantitation by GCMS) (5-8). These methods show some limitations. For instance, bioassays such as the endotoxin activity

assay (EAA) or LAL are restricted to the active LPS fraction and may not reflect total amounts of LPS in biological samples. They may thus produce false positive or false negative results (9). Quantitation of 3-hydroxymyristate by GCMS corresponds to the direct measurement of LPS mass (8), but the detection of small amounts of LPS in complex, lipid-containing biological media is restrained by the limited loading capacity of gas chromatography columns.

The aim of the present study was to set up a new LCMS2 method for the sensitive, accurate, and direct quantitation of total amounts of LPS in plasma. This new method was compared with GCMS and LAL assays, which were used in the present study as reference methods. Finally, the LCMS2 method was combined with the LAL assay in an attempt to monitor neutralisation of LPS activity in biological media.

Materials and Methods

Animals

Wild-type, C57BL6/J mice (3 months old) were provided by Charles River Laboratories International (L'Arbresle, France). PLTP-deficient (PLTP^{-/-}) mice, generated by Dr Jiang and Colleagues (10), were on a homogeneous C57BL6/J background for at least eight generations. The mice were fed a standard chow diet (A03 diet; Safe, Augy, France) and had free access to water and food. All experiments involving animals were performed in accordance with the institutional guidelines and approved by the University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (protocol number 2511).

Reagents

LPS from *Escherichia coli* - serotype O55:B5 was purchased from Sigma (Sigma Chemicals)

Intralipid

Internal standard

LPS injection and blood sampling

All materials were of pyrogen-free grade or made apyrogenic by overnight heating at 150°C, and all of the reagents used were of “endotoxin-free” grade. LPS from *Escherichia coli* - serotype O55:B5 (Sigma Chemicals) was suspended in endotoxin-free, 0.15 mol/l sodium chloride, and vigorously mixed for 15 min before use. LPS was injected into the mice intraperitoneally (1.9 mg/kg body weight; single dose). Blood was then collected at the indicated times by retro-orbital puncture. Plasma was obtained by blood centrifugation (10 min, 2000 x *g* at 4°C).

Human plasma samples

Plasma samples from 21 patients (11 males/10 females, 64.6±17.5 years, body mass index 24.9±8.0 kg/m²) with infectious systemic inflammatory response syndrome, but presenting a negative LAL test had been collected in a previous study (2). Sepsis in all patients was defined according to the criteria of the panel of experts from the *American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine* (11), and 9 patients developed septic

shock. Sites of infection were the lungs (12 cases), abdomen (5 cases), urinary tract (2 cases) and other (2 cases). Infection was documented by bacteriological analysis in 13 cases. Fifteen patients presented with cardiovascular disease, 4 with type 2 diabetes, 9 with respiratory disease, 3 with cancer and 4 with impaired renal filtration. Fasting blood samples were collected within the first 24 hours of the sepsis episode, and they were kept at -80°C until analysis. The study protocol was approved by the institutional review board for human experimentation (Pitié-Salpêtrière's Ethical Committee), and written informed consent was obtained from the patients or their next of kin.

LAL assay

Biological activity of LPS was quantified by the endpoint chromogenic LAL assay (QCL-1000 kit; Lonza, Walkersville, MD USA), which gives a magenta colour when positive. Briefly, 50 µl of diluted plasma (1:1 dilution in endotoxin-free water) were dispensed in each well of a 96-well plate. At the initial time point, 50 µl of the LAL reagent were added to each well. The plate was shaken and incubated at 37°C for 10 minutes. Then, 100 µl of chromogenic substrate warmed to 37°C was added to each well and incubation was extended for an additional 6 minutes at 37°C. The reaction was stopped by adding 100 µl of a 25% solution of glacial acetic acid. Absorbance was measured at 405 nm on a spectrophotometer (Perkin Elmer, Victor 3).

Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis

LPS concentration was determined by direct quantitation of 3 β -O-trimethylsilyl ether-tetradecanoic methyl ester by GC-MS. Briefly, 25 µl of plasma spiked with 50 ng of internal standard (3 β -hydroxytridecanoic acid 10 mg/ml in ethanol) was hydrolysed with 75 µl of NaCl 150 mmol/L and 300 µl of HCl 8 mol/L for 4 hours at 90°C. Free fatty acids were then extracted with 600 µl of distilled water and 5 ml of hexane. After evaporation of the hexanic phase, fatty acids were methylated with 250 µl of BF₃/MeOH (1:9) for 30 min at 60°C. The methylation solution was then evaporated under N₂ stream. The dried extract was further incubated for 1 hour at 80°C with 100 µl of N,O-Bis(trimethylsilyl)TriFluoroAcetamide /TriMethyl-ChloroSilane (BSTFA/TMCS, 4:1) solution for derivatization. Silylating solution was then evaporated under N₂ stream.

Finally 100 µl of hexane was added and 1 µl of the mixture was injected in the split/splitless mode (split ratio 10:1) as previously described (12) on an Agilent GC 6890, MSD 5973 device.

High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LPS concentration was determined by direct quantitation of 3 β -hydroxytetradecanoic acid by LC-MS/MS. Briefly, 25 µl of plasma spiked with 50 ng of internal standard (3 β -hydroxytridecanoic acid 10 mg/ml in ethanol) was hydrolysed with 75µl of NaCl 150 mmol/L and 300 µl of HCl 8 mol for 4 hours at 90°C. Free fatty acids were then extracted with 600 µl of distilled water and 5 ml of hexane. After vacuum evaporation of the hexanic phase, fatty acids were dissolved in 100 µl of a 40%A/60%B eluent mixture (eluent A: acetate ammonium 5 mmol/L pH5.0; eluent B: acetonitrile / acetate ammonium 5 mmol/L pH7.3 96.7%/3.3% (13). Fatty acid separation was performed in an Infinity 1200 HPLC binary system (Agilent) equipped with a Poroshell 120 EC C18 100 x 4.6 mm 1.7 µm column (Agilent) set at 30°C. The sample volume injected was 10 µl. A 7-min eluent gradient was established as follows: from 0 to 0.5 minutes, the flow was maintained constant at 1 ml/min of 80% B; then the proportion of B increased linearly up to 100% in 1 min; concomitantly the flow rate was decreased to 0.5 ml/min; these conditions were maintained constant for 1 min; then flow rate was increased up to 1 ml/min for an additional 2.5 min; finally, the column was re-equilibrated with 80% B at 1ml/min for 2.5 min. MS/MS detection was performed using a QQQ 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a JetStream ESI source in the negative mode (Gas temperature 300°C, Gas flow 10 L/min, Nebulizer 20 psi, Sheath gas temperature 200°C, Sheath gas flow 11 L/min, Capillary 3500 V). Nitrogen was used as the collision gas. The mass spectrometer was setup in the MRM mode for the quantification of selected ions as follows:

3 β -hydroxytetradecanoic acid: precursor ion 243.2 Da; product ion 59 Da, fragmentor 93 V, collision cell 9 eV. 3 β -hydroxytridecanoic acid: precursor ion 229.2 Da; product ion 59 Da, fragmentor 110 V, collision cell 10 eV.

Statistics

Linear regression analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA. For clinical data, values are presented as mean \pm SD, or n (%). Dichotomic data were compared by the chi-square test for trends. Continuous data were compared by the Mann-Whitney *U*-test. Differences with a p value below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Supplemental figure 1 shows the chromatograms of 3-hydroxymyristic acid (extracted from plasma of mice intraperitoneally injected with LPS) and of hydroxytridecanoic acid (used as an internal standard) using the LCMS2 method as described under material and methods. As expected from molecular structures, 243.2 →59 and 229.2 →59 transitions were obtained by tandem mass spectrometry for 3-hydroxytetradecanoic (RT = 1.87 min) and 3-hydroxytridecanoic acid (RT = 1.49 min), respectively (Supplemental Figure 1A and 1C). Supplemental figure 1 shows extracted chromatograms corresponding to the [M-15]⁺ ion (m/z = 301.2) of 3-OTMS-tridecanoic-methyl ester (RT = 13.31 min), and the [M-15]⁺ ion (m/z = 315.2) of 3-OTMS-tetradecanoic-methyl ester (RT = 15.27 min) as obtained by GCMS (supplemental figure 1B and 1D). To assess the repeatability of the LCMS2 method, plasma samples were spiked with 3-hydroxymyristate (final concentration, 50 ng/mL). The LCMS2 assay, conducted in triplicate in three independent experiments by three distinct operators, led to a coefficient of variation of 14% with a 92% recovery.

Plasma samples containing variable amounts of LPS were obtained from wild-type mice, which had been injected intraperitoneally with LPS from *Escherichia coli* (O55:B5). The concentration of 3-hydroxymyristate in the collected plasma samples (n=71) was measured by the newly developed LCMS2 method and by GCMS, which was used as the reference method. The linear regression analysis of concentrations obtained with the two methods gave a slope of 0.86 ± 0.01 , an intercept of 4.97 ± 3.43 , and an r^2 value of 0.9906 ($P < 0.0001$) (Figure 1A). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) values for 3-hydroxymyristate measurements in mouse plasma were 18 and 60 ng/ml with GCMS, and 12 and 40 ng/ml for LCMS2, respectively (Figure 1B). With 3-hydroxymyristic acid concentrations below the LOQ values, a poorer, but still significant correlation between the GCMS and LCMS2 methods was observed (slope, 0.88 ± 0.16 ; intercept, 4.59 ± 2.99 ; $r^2 = 0.4587$, $P < 0.0001$) (Figure 1B).

A significant but weaker correlation was observed when endotoxin values obtained over the entire range by using the newly developed LCMS2 method was compared with the classical LAL assay. Here, linear regression analysis gave a slope of $4.10E-5 \pm 0.56E-5$, an intercept of 0.0418 ± 0.0017 , and an r^2 value of 0.3886 ($P < 0.0001$) (Figure 2A). In this case,

however, there was no significant correlation between the two methods when LPS concentration values ranged between the LOD and LOQ concentration values (Figure 2B). As shown in Supplemental Figure 2, the LCMS2 method was relevant for the determination of 3-hydroxymyristate levels in the lipid-rich, Intralipid medium, and consistent results were obtained with distinct LPS doses and after distinct incubation times at 37°C. Under the same experimental conditions, the chromogenic LAL assay was found to be unable to quantitate LPS due to the high turbidity of the Intralipid mixture (not shown).

As for Intralipid, LCMS2 measurements of 3-hydroxymyristate after spiking total plasma with known amounts of LPS were consistent with expected concentrations and were not affected by incubation at 37°C (Figure 3A). In contrast to what was observed with LCMS2, plasma samples from wild-type mice showed a potent and remarkable ability to tone down the LAL response in a time-dependent manner (Figure 3B). Indeed, and even with a high load of LPS, more than 85% of the initial LAL level could be blunted by 4 hours of incubation of total plasma at 37°C, thus contrasting with the endurance of LPS measurements by the LCMS2 method. The ability of mouse plasma to mask the LAL response was further demonstrated *in vivo*. Whereas both LAL and LCMS2 assays peaked within a few hours following the initial intraperitoneal injection of LPS, the curve decay in plasma over a 24-hour period was much steeper when LPS was assayed with the LAL method than with the LCMS2 assay (Figure 4). This suggests that over time both neutralization and clearance of plasma LPS may have contributed to apparently lower values for the LAL assay at the 4-, 6-, and 24-hour time points. To determine whether the combination of the biological LAL assay and the direct LCMS2 assay might be relevant in assessing LPS neutralizing activity, both assays were applied to plasma samples of wild-type mice (with naturally high PLTP activity and LPS detoxifying potential) and PLTP-deficient mice (with impaired ability to associate LPS with circulating lipoproteins, so as to detoxify LPS in the liver and to tone down the inflammatory response (12)). As shown in Figure 5, and at the 0.5 and 1.5 hour time points, the LAL to LCMS2 ratio values were significantly higher in PLTP-deficient than in wild-type mice.

Finally, and in order to bring insights into the pathophysiological and clinical relevance of the newly developed LCMS2 method, and to document its added value over the classical

LAL assay, it was applied to the quantitation of LPS in total plasma of a subset of patients with SIRS, with documented infection but with a negative plasma LAL test. Remarkably, significant amounts of 3-hydroxymyristate were measured in the plasma of SIRS patients, with concentrations ranging between 15.7 and 68.3 ng/mL. The patient distribution on the two sides of the median, 27.8 ng/ml concentration value made it possible to distinguish between two groups with low/infra-median (3-hydroxymyristate, 23.24 ± 3.36 ng/ml) and high/supra-median (3-hydroxymyristate, 41.87 ± 12.97 ng/mL) LPS concentrations ($P < 0.0001$). Interestingly, patients in the high LPS subgroup showed significantly higher urea ($P < 0.05$), creatinine ($P < 0.05$) and renal SOFA ($P < 0.005$) values, with a higher occurrence of septic shock ($P < 0.05$) (Table 1).

Discussion

In this study, we set up a new assay for the direct quantitation of LPS by using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LCMS2). The combination of the direct LCMS2 quantitative assay with the LAL biological activity assay is proposed as a relevant and practical approach to evaluate neutralization of LPS biological activity in a sample.

The present work relates to a method for quantifying hydrolysed 3-hydroxymyristic acid (*i.e.* a specific fatty acid component of the lipid A moiety of the LPS molecule (5)), which was extracted with an organic solvent, separated by reversed phase HPLC and analysed by MS/MS in a triple quadrupole mass spectrometer. The LCMS2 method is shown to be a reliable, practical, accurate, reproducible, and sensitive method. Importantly, the intra-test coefficient of variability for the LCMS2 assay was clearly below the poor values reported for LAL, which was thus considered a semi-quantitative assay by others (4). In addition, the very good linear response for LCMS2 in both the low and high LPS range is compatible with the wide range of endotoxemia values that can be encountered in *in vitro* experiments, in animal studies and in human populations. An additional advantage of the LCMS2 method lies in the fact that it was not affected by the lipid content of samples, even when added to lipid-rich Intralipid. This was an important point to confirm because of the lipidic nature of LPS, its propensity to associate with lipid-rich particles (15), and the confounding effect of elevated lipid levels in the LAL bioassay (15-17).

In earlier studies, the direct quantitative assay of 3-hydroxymyristic acid was conducted by using gas chromatography in combination with mass spectrometry (8,18-21). While a highly significant correlation between GCMS and LCMS2 methods is reported in the present study, the new LCMS2 method presents several advantages over GCMS for LPS measurement. Indeed, LCMS2 avoids the methanolysis and derivatization steps of GCMS, is less time-consuming, and does not involve toxic reagents. Most importantly, the use of tandem mass spectrometry in the MRM mode in our LCMS2 method allowed us to improve the specificity and the limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ). This is particularly important in the context of LPS detection because even low-grade endotoxemia values are known to be sufficient to trigger an inflammatory response *in vivo* (22,23).

Following a single, intraperitoneal injection of LPS in wild-type mice, clear differences appeared over time between the LAL and the LCMS2 assays. Indeed, biological activity of LPS as measured by the LAL assay came back to barely detectable levels 6 hours after injection. In contrast, and unlike LAL data, direct quantitation of 3-hydroxymyristate by LCMS2 revealed that LPS were actually maintained at elevated levels in the plasma compartment of wild-type mice for much longer, in this case, with substantial/high levels of LPS still detectable at the 24-hr time point. Most importantly, quantitative analysis by LCMS2 revealed that maximal plasma levels of LPS were actually measured after 6 hours, thus indicating that 1) the bulk of circulating LPS was still present in the plasma compartment at this time, and 2) that, in accordance with earlier reports (8,24), the LAL assay can produce false negative results in native plasma. These findings are in agreement with earlier studies, which reported that *in vitro* incubation of plasma can mask LPS detection in a concentration-dependent manner (25-27). The combination of the LAL and LCMS2 analyses in the present study provided new evidence of the intrinsic capacity of plasma to neutralize the activity of LPS. Alteration of the LAL to LCMS2 ratio may rely to a large extent on the recognized ability of endogenous plasma lipoproteins to bind and neutralize LPS, because significantly lower values were calculated in wild-type mice than in PLTP-deficient mice, which are known to have impaired LPS neutralization ability (12). Here, rather than a surrogate for quantitation of total LPS amounts, the LAL assay was used as a direct *in vivo* evaluation of biologically active LPS. Finally, calculation of the LAL (activity) to LCMS2 (mass) LPS ratio is proposed as a relevant method to assess *in vivo* the efficacy of the initial step of LPS neutralization (known as the endotoxin-lipoprotein hypothesis – 28). This step is followed by lipoprotein-mediated transport to the liver and ultimate detoxification in the bile (29,30).

Even though the LAL assay has been used in most studies dealing with endotoxemia measurement, it has been repeatedly reported to be negative in some patients with sepsis (31,32), and not to be clinically useful for detecting Gram-negative infections or predicting patient outcome (14,33,34). Surprisingly, earlier studies reported that LAL positivity was observed in only 20% of patients presenting with sepsis at entry into an Intensive Care Unit (14,34). This indicates that the LAL assay cannot accurately identify patients with Gram negative infection and endotoxemia. The present study brings direct evidence of the

advantages of the LCMS2 method, in particular because it precludes at least some of the false negative results of LPS bioassays. In our study, for example, 50% of patients with a 3-hydroxymyristate concentration above 27.8 ng/ml had a negative LAL test.

Although the present study was not designed to address clinical outcomes, the subgroup of patients with supra-median plasma LPS levels showed higher urea, creatinine and renal SOFA values and a more frequent occurrence of septic shock than did patients with infra-median values, thus indicating that they were more severely ill. These results are in agreement with earlier studies which showed that endotoxemia was related to disease severity, the SOFA score, a higher plasma lactate concentration, lower systemic vascular resistances, depressed ejection fractions, a greater need for vasopressors, and a greater risk of dying (34-36). Thus, it can be anticipated that LPS measurement by LCMS2 could become a promising tool in the diagnosis, follow-up and therapeutic management of patients with sepsis. It might also be relevant in investigating other pathophysiological states that may be associated with acute or low-grade endotoxemia (including cirrhosis, inflammatory bowel diseases, periodontitis, obesity, Type2 diabetes, and high fat feeding,...) (22,37-40).

In conclusion, the combined results of the LAL and LCMS2 analyses bring to the fore a novel way to assess the LPS neutralization capacity *in vivo* and to determine the proinflammatory potential of LPS molecules when present in various biological media. Whether there may be a place for routine LCMS2 measurement of endotoxemia in clinical practice, and whether its combination with the LAL assay is promising for quantitation of inactive LPS and monitoring of the endotoxin neutralizing capacity of the patients deserve further attention. In addition, the features of the LCMS2 method suggest that it might be useful to quantitate LPS content of a large variety of media, including water, air dust, food matrices, tissues and biological fluids.

Disclosures / Conflict of interest

This work was supported by the INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), the Regional Council of Burgundy, the University of Burgundy, the Fondation de France, Oseo/Banque Publique d'Investissement, and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d'Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx.

Acknowledgements

We thank Philip Bastable for editing this article.

References

1. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013;381:774-5.
2. Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M, Memain N, Philippart F, Misset B, et al. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS One* 2012;7:e38916.
3. Gibot S, Béné MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:65-71.
4. Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. [Epub ahead of print] *Crit Care* Apr 25, 2013 as doi:10.1186/cc12598.
5. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:169-76.
6. Das AP, Kumar PS, Swain S. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosens Bioelectron* 2014;51:62-75
7. Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, Hoffmann S, Hennes K, Halder M, et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J Immunol Methods* 2006;316:42-51.
8. Maitra SK, Schotz MC, Yoshikawa TT, Guze LB. Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:3993-7.

9. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J, et al. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. Crit Care. 2002;6:342-8.
10. Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall AR. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. J Clin Invest 1999;103:907-14.
11. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-74.
12. Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna AL, et al. Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. J Biol Chem 2008;283:18702-10.
13. Zehethofer N, Pinto DM, Volmer DA. Plasma free fatty acid profiling in a fish oil human intervention study using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2008;22:2125-33.
14. Cohen J. The detection and interpretation of endotoxaemia. Intensive Care Med 2000;26:S51-6.
15. Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Calhoun MC, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons enhance endotoxin excretion in bile. Infect Immun. 1993;61:3496-502.
16. Rood J, Smith SR. Triglyceride concentrations and endotoxemia. Am J Clin Nutr 2008 Jul;88:248-9
17. Emancipator K, Csako G, Elin RJ. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. Infect Immun. 1992;60:596-601.

18. Brandtzaeg P, Bryn K, Kierulf P, Øvstebø R, Namork E, Aase B, et al. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography-mass spectrometry, ultracentrifugation and electron microscopy. *J Clin Invest* 1992;89:816–23.
19. Szponar B, Norin E, Midtvedt T, Larsson L. Limitations in the use of 3-hydroxy fatty acid analysis to determine endotoxin in mammalian samples. *J Microbiol Methods* 2002;50:283–9.
20. Maitra SK, Nachum R, Pearson FC. Establishment of β -hydroxy fatty acids as chemical marker molecules for bacterial endotoxin by gas chromatography-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:510–14.
21. Szponar B, Kras'nik L, Hryniewiecki T, Gamian A, Larsson L. Distribution of 3-Hydroxy Fatty Acids in Tissues after Intraperitoneal Injection of Endotoxin. *Clin Chem* 2003;49:7,1149-53.
22. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-72.
23. Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes* 2014;63:471-82.
24. Fink PC, Lehr L, Urbaschek RM, Kozak J. Limulus amebocyte lysate test for endotoxemia: investigations with a femtogram sensitive spectrophotometric assay. *Klin Wochenschr* 1981;59:213-8.
25. Balagopal A, Gama L, Franco V, Russell JN, Quinn J, Higgins Y, et al. Detection of microbial translocation in HIV and SIV infection using the Limulus amebocyte lysate assay is masked by serum and plasma. *PLoS One* 2012;7:e41258.

26. Levin J, Tomasulo PA, Oser RS. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. J Lab Clin Med 1970;75:903-11.
27. Hurley JC, Tosolini FA, Louis WJ. Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. J Clin Pathol 1991;44:849-54.
28. Rauchhaus M, Coats AJ, Anker SD. The endotoxin-lipoprotein hypothesis. Lancet 2000;356:930-3.
29. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. Biochem Soc Trans 2011;39:984-8.
30. Duheron V, Moreau M, Collin B, Sali W, Bernhard C, Goze C, et al. Dual labeling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy. ACS Chem Biol 2014;9:656-62.
31. Stumacher RJ, Kovnat MJ, McCabe WR. Limitations of the usefulness of the Limulus assay for endotoxin. N Engl J Med 1973;288:1261-4.
32. Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, Miller EB, Novitsky TJ, Sands K, et al. Limulus amebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group Clin Infect Dis 1998;27:582-91.
33. Feldman S, Pearson TA. The Limulus test and gram-negative bacillary sepsis. Am J Dis Child 1974;128:172-4.
34. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. Chest 1991;99:169-75.

35. Ikeda T, Ikeda K, Suda S, Ueno T. Usefulness of the endotoxin activity assay as a biomarker to assess the severity of endotoxemia in critically ill patients. [Epub ahead of print] *Innate Immun* Jan 7, 2014 as doi:10.1177/1753425913516885.
36. Hurley JC. Reappraisal with meta-analysis of bacteremia, endotoxemia, and mortality in gram-negative sepsis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1278-82.
37. Wilkinson SP, Moodie H, Stamatakis JD, Kakkar VV, Williams R. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 1976;2:1415-8.
38. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000;6:205-14.
39. Kallio KA, Buhlin K, Jauhiainen M, Keva R, Tuomainen AM, Klinge B, et al. Lipopolysaccharide associates with pro-atherogenic lipoproteins in periodontitis patients. *Innate Immun* 2008;14:247-53.
40. Vergès B, Duvillard L, Lagrost L, Vachoux C, Garret C, Bouyer K, et al. Changes in lipoprotein kinetics associated with type 2 diabetes affect the distribution of lipopolysaccharides among lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:E1245-53.

Figure legends

Supplemental Figure 1. Representative chromatograms of hydroxytetradecanoic acid and hydroxytridecanoic acid obtained by LCMS2 and GCMS analysis. LCMS2 (A and C) and GCMS (B and D) were used to generate chromatograms with 50ng of 3-hydroxytridecanoic acid used as the internal standard (A and B) and with 3-hydroxytetradecanoic acid extracted from 25µl of plasma from mice that had been injected intraperitoneally with LPS (B and D). Hydrolysis, fatty acid extraction, derivation, LCMS² MRM and GCMS SIM analysis conditions are described in the material and methods section. Panel A: extracted chromatogram corresponding to the 229.2 →59 transition of 3-hydroxytridecanoic acid (RT = 1.49 min) obtained by LCMS2. Panel B: extracted chromatogram corresponding to the [M-15]⁺ ion (m/z = 301.2) of 3-OTMS-tridecanoic-methyl ester (RT = 13.31 min) obtained by GCMS. Panel C: extracted chromatogram corresponding to the 243.2 →59 transition of 3hydroxytetradecanoic acid (RT = 1.87 min) obtained by LCMS2. Panel D: extracted chromatogram corresponding to the [M-15]⁺ ion (m/z = 315.2) of 3-OTMS-tetradecanoic-methyl ester (RT = 15.27 min) obtained by GCMS.

Figure 1. Comparison of sensitivity and accuracy of LCMS2 and GCMS techniques for LPS quantitation in plasma samples. Mouse plasma samples containing variable amounts of LPS were obtained after intraperitoneal injection of LPS from *Escherichia coli* (O55:B5) and were subjected to HCl hydrolysis and lipid extraction as described in the materials and methods section. One aliquot of the resulting preparation was analysed by LCMS2 and another aliquot was analysed by GCMS for quantitation of 3-hydroxymyristate and calculation of plasma LPS concentration (see materials and methods). Panel A shows the linear regression curve built by plotting LPS values determined by GCMS against LPS values determined by LCMS2. Panel B shows the linear regression curve as well as the determination of the limit of detection (LOD) and of the limit of quantification (LOQ) of LCMS2 and GCMS by using the lowest values (0-40ng/ml range) of LPS levels in mouse plasma.

Figure 2. Comparison of sensitivity and accuracy of LCMS2 and LAL techniques for LPS quantitation in plasma samples. Mouse plasma samples containing variable amounts of LPS were obtained after intraperitoneal injection of LPS from *Escherichia coli* (O55:B5) and blood collection by retroorbital puncture. For each sample, one aliquot was directly analysed by LAL assay and another aliquot was subjected to HCl hydrolysis and lipid extraction prior to quantitation of 3-hydroxymyristate by LCMS2 and calculation of plasma LPS concentration (see materials and methods). Panel A shows the linear regression curve built by plotting LPS values determined by LAL assay against LPS values determined by LCMS2. Panel B shows the determination of the limit of detection (LOD) and of the limit of quantification (LOQ) of LCMS2 and LAL assay by using the lowest values (0-40ng/ml range) of LPS levels in mouse plasma; no significant correlation between LAL and LCMS2 was observed in the low range of LPS levels ($R^2 = 7E-5$).

Supplemental Figure 2. Determination of 3-hydroxymyristate levels by LCMS2 in Intralipid. Increasing amounts of purified LPS were added to Intralipid, which was incubated for 15 min, 30 min, 1 hour, 2 hours or 4 hours at 37°C. Incubated samples were analysed by LCMS2 for the quantitation of 3-hydroxymyristate as described in the Materials and Methods section.

Figure 3. Effect of incubation on the 3-hydroxymyristate levels determined by LCMS2 in human plasma. Total human plasma was spiked with known amounts of LPS, and incubated at 37°C for 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 hours or 4 hours. Incubated samples were analysed by LCMS2 for quantitation of 3-hydroxymyristate (A) and by LAL assay (B) as described in the Materials and Methods section.

Figure 4. Plasma kinetic curves of LPS levels determined by LCMS2 and LAL assay in wild-type mice.

Wild-type C57BL/ mice (n=6) were injected intraperitoneally with LPS from *Escherichia coli* (O55:B5). Blood samples were drawn by retroorbital puncture before injection (time 0) and 0.5, 1, 3, 6, 24 and 48 hours after injection and plasma was obtained after centrifugation. For each plasma sample one aliquot was analysed by LAL assay (dotted

line) and another by LCMS2 (full line) for LPS quantitation as described in materials and methods. Values are expressed in ng/ml (for LCMS2) or in absorbance units (for LAL) and are the means of 6 animals \pm SEM.

Figure 5. Ratio of LPS activity to LPS mass concentration determined in wild-type and PLTP-deficient mice.

Blood samples were drawn by retroorbital puncture before injection (time 0) and 0.5, 1.5, 3, and 6 hours after injection of *Escherichia coli* LPS (O55:B5, 1 mg/kg body weight). Plasma was obtained after centrifugation. LPS biological activity (LAL assay) to LPS mass concentration (direct 3-OH-myristate assay) ratios were determined over the 6-hour period in wild type (full line) and PLTP-deficient (PLTP^{-/-}) mice (dotted line). Vertical bars are mean \pm sem of 6 animals. **P<0.01 significantly different from WT mice.

Table of contents

Table 1 – Biological and clinical parameters of subgroups of SIRS patients according to plasma LPS concentration.

	LPS below median ≤ 27.8 ng/ml	LPS above median >27.8 ng/ml	P value
N	11	10	
LPS (3-hydroxymyristate, ng/ml)	23.24 ± 3.36	41.87 ± 12.97	0.0001
Urea (mmol/L)	9.13 ± 7.11	15.44 ± 6.67	0.0304
Creatinine (μmol/L)	101.91 ± 54.98	166.25 ± 85.57	0.0241
pH	7.39 ± 0.06	7.29 ± 0.15	0.1188
Renal SOFA Score	0.27 ± 0.65	1.20 ± 1.14	0.0046
Septic shock (%)	2 (18)	7 (70)	0.0166

Values are presented as mean ± SD, or n (%). Dichotomic data were compared by the chi-square test for trends. Continuous data were compared by the Mann-Whitney *U*-test

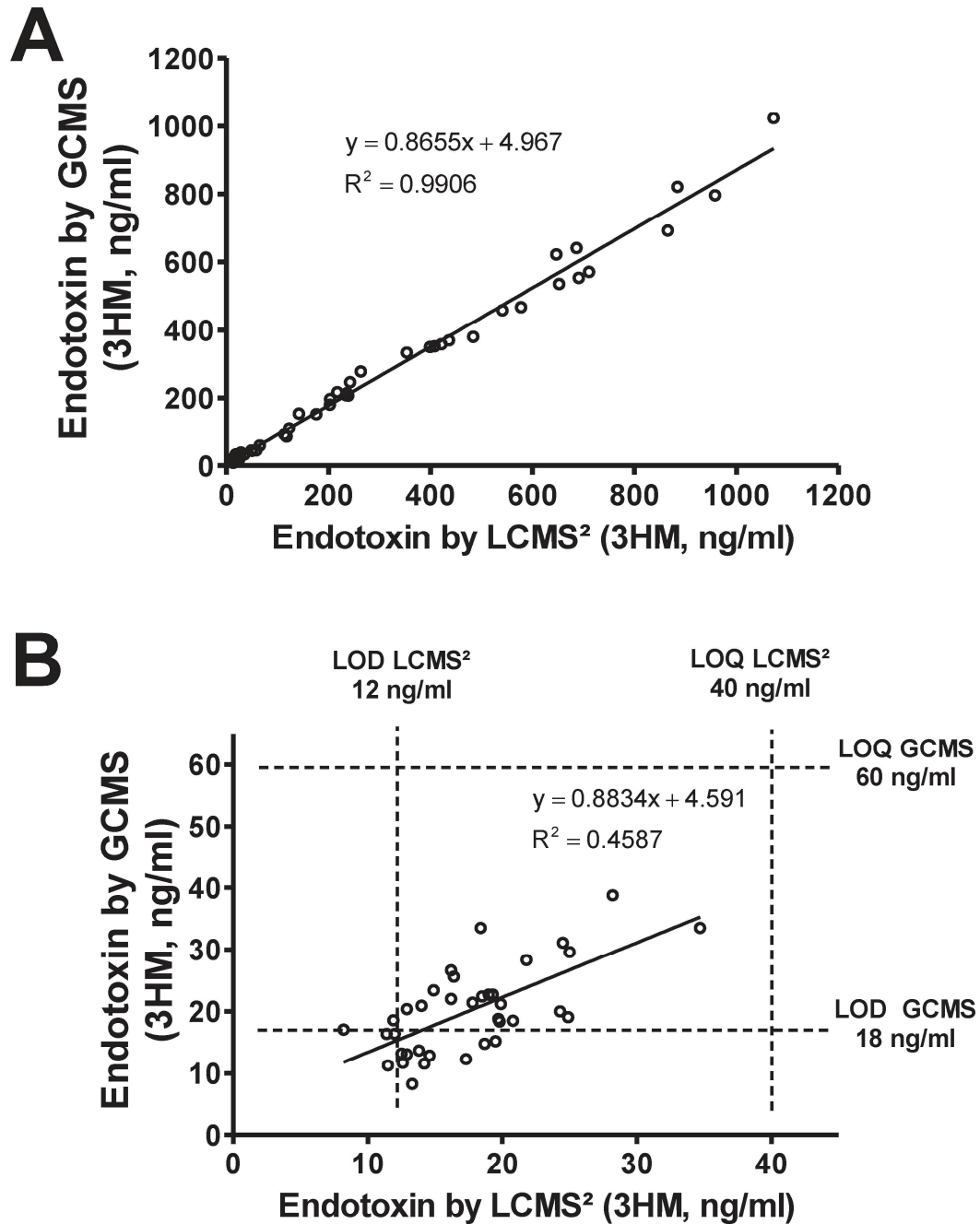
Figure 1 Pais de Barros et al.

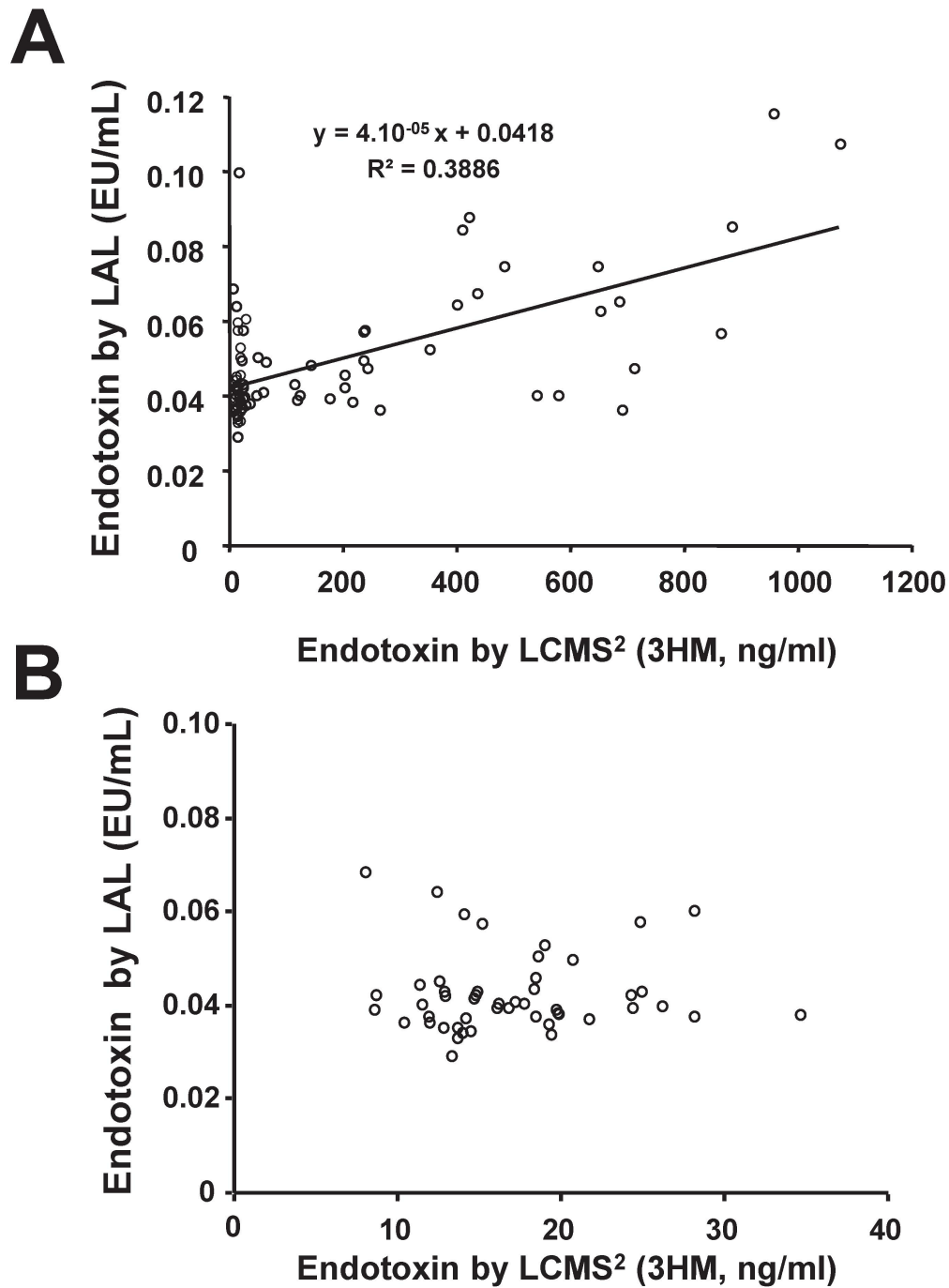
Figure 2 Pais de Barros et al.

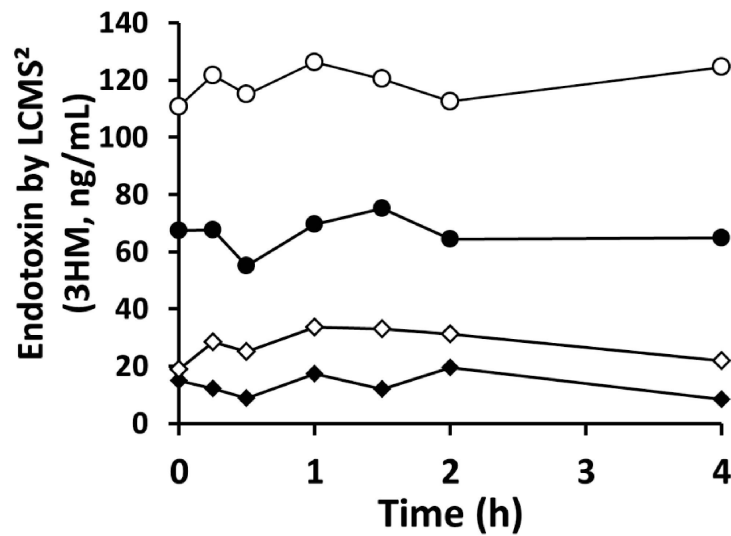
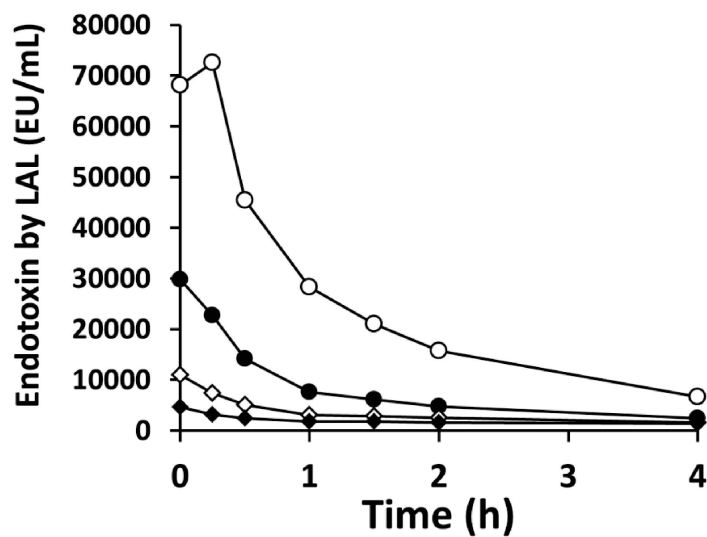
Figure 3 Pais de Barros et al.**A****B**

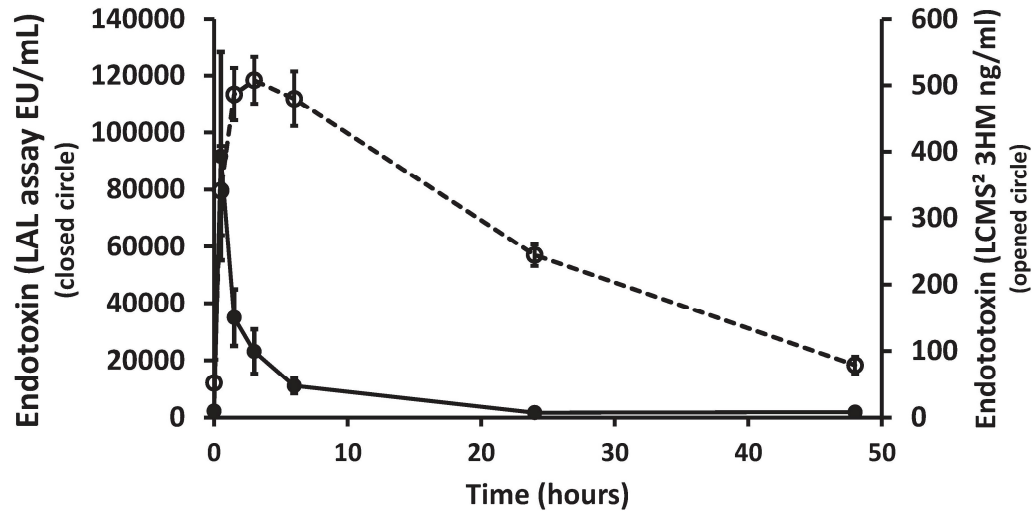
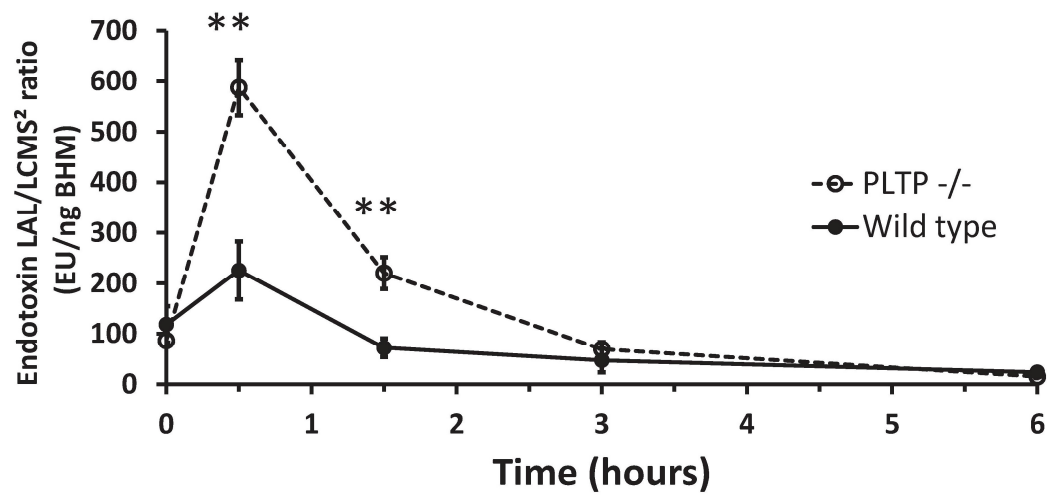
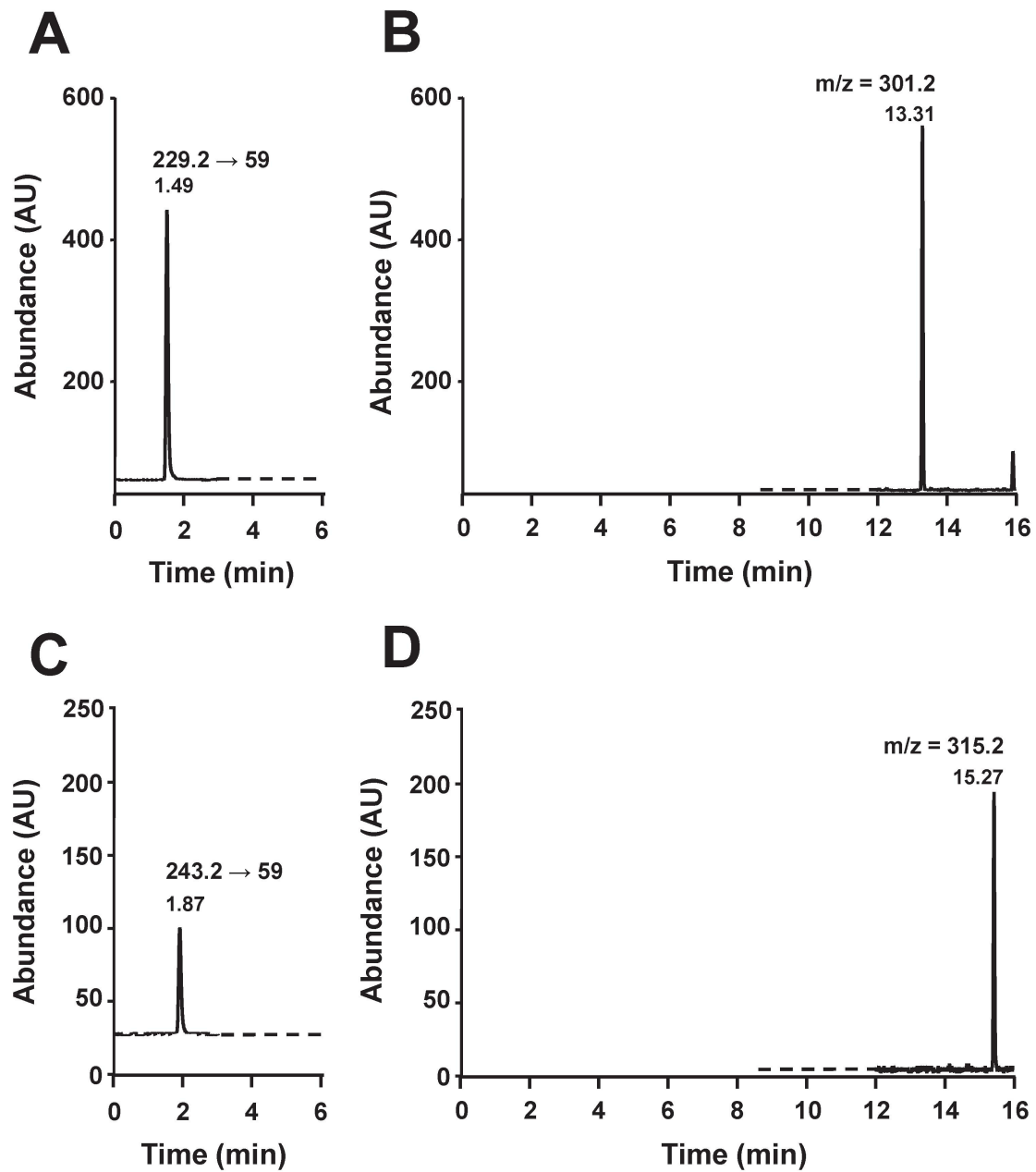
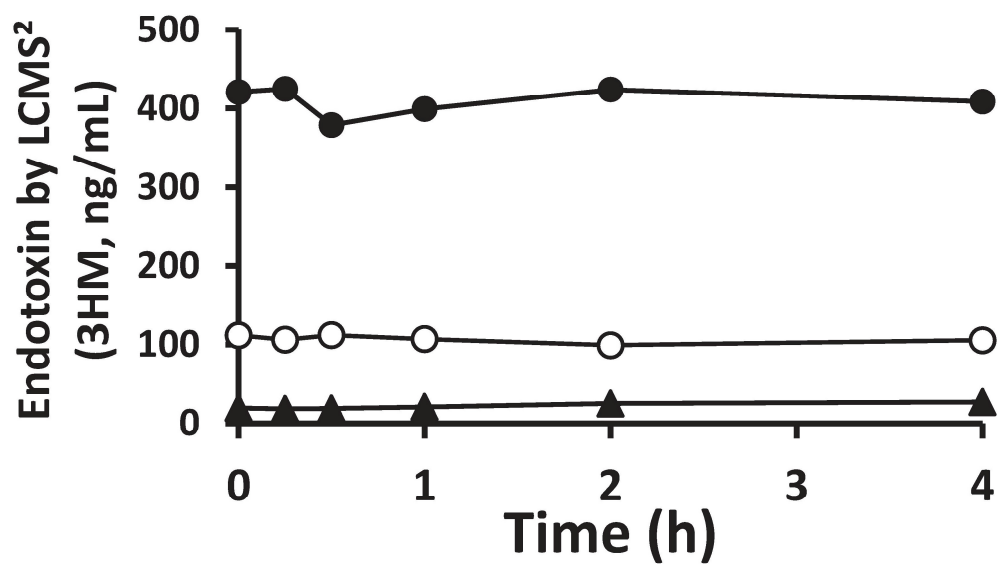
Figure 4 Pais de Barros et al.

Figure 5 Pais de Barros et al.

Supplemental figure 1 Pais de Barros et al.



Supplemental figure 2 Pais de Barros et al.

II. Article n°2 : Polysaccharide chain length of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* is a determinant of aggregation, plasma clearance and proinflammatory effect

Fiche introductive	<p>Introduction</p> <p>En tant qu'inducteur des modèles d'étude de l'inflammation et du sepsis, ainsi que responsable du choc endotoxinique, l'étude du LPS et notamment la compréhension de la corrélation entre sa structure chimique et ses effets pro-inflammatoires représentent un grand enjeu scientifique et clinique. Le LPS est constitué de deux grandes régions, la chaîne polysaccharidique et le lipide A. Ce dernier est unanimement reconnu comme le principe responsable de l'activité biologique du LPS. En outre, l'agrégation du LPS en complexe supramoléculaire est considérée comme un phénomène modulant l'accessibilité aux récepteurs cellulaires et donc ses effets physiopathologiques LPS.</p>
	<p>Comment la chaîne polysaccharidique impacte-t-elle l'agrégation, le métabolisme et les effets pro-inflammatoires du LPS ?</p>
	<p>Méthodologie</p> <p>Différents chémotypes de LPS provenant de <i>Salmonella minnesota</i> ("<i>smooth-LPS</i>" vs "<i>rough-LPS</i>") avec des régions lipide A identiques et des longueurs de chaînes polysaccharidiques différentes, ont été utilisés selon 2 axes de recherche :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une approche physico-chimique pour caractériser l'agrégabilité des LPS (AFM, TEM, DLS, potentiel zêta, fluorescence à l'état stable de sondes pyrènes) ; - une étude du métabolisme des LPS et de ses effets physiopathologiques chez la souris (dosage cytokines, dosage des LPS plasmatique et dans les organes par LC-MS/MS).
	<p>Résultats</p> <p>Comparé aux "<i>smooth-LPS</i>" avec une longue chaîne, les "<i>rough-LPS</i>" avec une chaîne courte donnent des agrégats plus larges, avec un index d'hydrophobicité plus élevé, un potentiel zêta plus négatif et une concentration d'agrégation critique plus élevée. La clairance plasmatique et l'assimilation hépatique des "<i>rough-LPS</i>" sont plus rapides que celles des "<i>smooth-LPS</i>". La réponse inflammatoire sur 24 heures est plus faible avec les "<i>rough-LPS</i>" qu'avec les "<i>smooth-LPS</i>".</p>
	<p>Conclusion</p> <p>Une chaîne polysaccharide longue potentialise donc les effets pro-inflammatoires du LPS en induisant la formation d'agrégats plus stables dont le temps de résidence plasmatique <i>in vivo</i> est augmenté, ainsi que les effets pro-inflammatoires.</p> <p>Dans le cadre des travaux de recherche utilisant ou étudiant les LPS, il est donc nécessaire de considérer la relation entre la longueur de chaîne polysaccharidique des LPS et l'architecture des agrégats formés pour anticiper et comprendre correctement les effets physiopathologiques des LPS donnés. En outre, une meilleure compréhension du comportement d'agrégation du LPS favoriserait la mise au point de nouvelles stratégies d'optimisation de leur élimination par le transport inverse du LPS.</p>

Polysaccharide chain length of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* is a determinant of aggregation, plasma clearance and proinflammatory effect*

Wahib Sali[‡], Jean-Paul Pais de Barros[‡], Jérôme Labbé[‡], Valérie Deckert[‡], Vincent Duhéron[‡], Naig Le Guern[‡], Denis Blache[‡], Denis Chaumont[§], Eric Lesniewska[§], Benoit Gasquet[¶], Laurent Lagrost^{‡,¶} and Thomas Gautier^{‡,¶,1}

*Running title : *LPS structure, aggregability and in vivo behaviour*

From

[‡] Inserm Research Center - Lipid Nutrition Cancer - UMR866, University of Burgundy, Dijon, France

[§] Carnot Institute CNRS UMR6303, University of Burgundy, Dijon, France,

[¶] Cell Imaging Platform, University of Burgundy, Dijon, France

¹ CHU Dijon, University of Burgundy, Dijon, France

¹To whom correspondence should be addressed :

Thomas Gautier, Ph.D - Centre de Recherche INSERM UMR866, Université de Bourgogne
Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc - BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France.

Keywords: lipopolysaccharides (LPS); aggregation; pharmacokinetics; inflammation; mouse

Background: Bacterial lipopolysaccharides (LPS) form pro-inflammatory aggregates in the circulation.

Results: A long polysaccharide chain increases LPS aggregate stability, plasma residence time and inflammatory response in LPS-injected mice.

Conclusion: Polysaccharide chain length influences aggregation, plasma clearance and pro-inflammatory effect of LPS.

Significance: Better knowledge of LPS aggregation might be helpful in setting up new strategies to enhance LPS detoxication and to resolve inflammation.

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPS) originate from the outer membrane of Gram-negative bacteria and trigger an inflammatory response via the innate immune system. LPS consist of a lipid A moiety directly responsible for the stimulation of the pro-inflammatory cascade, and a polysaccharide chain of variable length. LPS form aggregates of variable size and structure in aqueous media. Using LPS variants of *Salmonella minnesota* with identical lipid A moieties, the aim of the present study was to determine to what extent the LPS polysaccharide chain length can affect the properties of LPS structures, their

pharmacokinetics and eventually the inflammatory response *in vivo*. As compared to smooth LPS with a long chain, rough LPS with a short chain formed larger aggregates (mean diameter, 91.3 *versus* 24.4 nm), with a higher hydrophobicity index (pyrene ratio, 0.963 *versus* 1.070), a more negative zeta potential (-33.0 *versus* -14.2 mV) and a higher critical aggregation concentration (2.7 *versus* 1.3 µmol/L). Strikingly, plasma accumulation of rough LPS was lower (-96% for the area under the curve, P<0.05) and its hepatic uptake was faster (+87% at 3 hours, P<0.05) than was the case for smooth LPS. The inflammatory response over 24 hours was significantly weaker with rough LPS than with smooth LPS (*i.e.* plasma IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1 and IFN-γ peaks were of lower magnitude - P<0.05 in all cases). The present data indicate that a long polysaccharide chain potentiates the pro-inflammatory effects of LPS by inducing the formation of more stable aggregates with a longer residence time *in vivo*.

Lipopolysaccharides (LPS², endotoxins) are amphipathic molecules that originate from the outer membrane of Gram-negative bacteria and which trigger the first step of the innate immune response by interacting with the CD14/TLR4/MD2 receptor complex at the

surface of leukocytes (1). The inflammatory response resulting from this initial stimulus consists of the production of pro-inflammatory cytokines. If uncontrolled, the response may lead to septic shock, which is characterized by hemodynamic dysfunctions, multiple organ failure and death of the host organism (2).

LPS are complex glycolipids containing an O-antigen polysaccharide, a core oligosaccharide, and an amphipathic lipid A moiety (3). The O antigen consists of the variable repetition of an oligosaccharidic unit. Due to its high variability in terms of length and nature of repeats, the O antigen determines the antigenic specificities between and within bacterial strains (3). Lipid A usually contains six fatty acid residues linked to two phosphorylated glucosamine sugars. It represents the active, pro-inflammatory moiety of LPS molecules as it binds directly to TLR4 and MD2 (4-6).

Although LPS molecules have been reported to interact with CD14, TLR4 and MD2 mainly as monomers, (6-8), it should be stressed that most LPS in nature behave as part of multiplying bacteria, dying bacteria or LPS-rich blebs (9). In addition, and because they are amphipathic compounds, purified LPS are rarely found as monomers but rather in the form of aggregates in aqueous media (9,10). This implies that activation of the innate immune response triggered by initial binding to the receptor complex requires the release of LPS monomers from either circulating aggregates (11) or aggregates bound to the immune cell surface (12). Considering this, it can be speculated that the physicochemical properties of aggregates may influence the endotoxic potency of LPS molecules.

Aggregate size is among the parameters thought to alter LPS pro-inflammatory potential. However, although some *in vitro* studies concluded that large aggregates have higher toxicity than smaller aggregates or monomeric LPS (12-14), others found the opposite (15), or no difference (16,17). Thus, features other than size probably influence the pro-inflammatory effect of LPS aggregates.

The length of the polysaccharide chain is among the putative candidates accounting for the variability of the endotoxic activity of LPS. Indeed, this hydrophilic moiety of LPS has an impact on LPS solubility in the aqueous phase

(18). Although the length of the polysaccharide chain might also influence the occurrence and size of LPS aggregates (19,20), its biological consequences are unknown. Because earlier studies compared LPS from different bacterial strains, which differed in both the lipid A and polysaccharide moieties, it was not possible to work out the real contribution of the hydrophilic chain to the endotoxic potential of the entire LPS molecule (3,9). Interestingly, Hardy and Colleagues reported that reconstituted aggregates containing LPS with a long polysaccharide chain tended to have an increased ability to activate TLR receptors compared to LPS with a short polysaccharide chain (17). However, this earlier work was restricted to *in vitro* studies of the ability of the different aggregates to activate signal transduction in a transgenic cell model expressing TLR4 and MD2 together with a reporter gene. To our knowledge, the influence of the length of the polysaccharide chain on the pro-inflammatory potency of LPS has not yet been studied *in vivo*. It is important to consider polysaccharide chain length which, as for a variety of circulating plasma factors (21-23), might modulate the bioavailability and efficacy of LPS.

The main goals of the present work were to compare the physicochemical properties of two LPS molecules with identical active lipid A moieties but with polysaccharide chains of various lengths and to determine to what extent they can influence the pharmacokinetics and proinflammatory properties of LPS *in vivo*. To this end, we compared LPS from two *Salmonella minnesota* strains, one of which has a short (rough LPS) and the other a long (smooth LPS) polysaccharide chain. In the first step, the physicochemical and structural studies combined dynamic light scattering (DLS), zetametry, steady-state fluorescence analysis of pyrene probes and transmission electron and atomic force microscopy. In the second step, smooth and rough LPS were injected into wild-type mice to determine the time course of cytokine production, LPS clearance from plasma and organ uptake.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and materials - LPS purified from *Salmonella enterica* serotype minnesota S strain (smooth LPS) and Re595 mutant strain (rough

LPS) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). For all experiments, lyophilised LPS were dissolved in endotoxin-free saline (0.15 mol/L sodium chloride; B Braun Medical, Melsungen, Germany) and vigorously mixed for 15 minutes before use. For each LPS preparation, an aliquot was analysed for molar titration by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy (LCMS², see below). All materials were of pyrogen-free grade or made apyrogenic by overnight heating at 150°C, and all the reagents used were of “endotoxin-free” grade. As assessed by LCMS², only trace amounts of LPS were detected in experimental media that were not supplemented with exogenous LPS.

LPS quantitation - LPS in plasma and organs as well as in preparations of long and rough LPS was assayed by using the direct quantitation of 3-hydroxymyristic acid, which is a specific component of the lipid A moiety of LPS, by LCMS² using the general procedure previously described (25). Quantitation was achieved by calculating the ratio between ion peaks corresponding to 3-hydroxymyristic acid, and 3-hydroxytridecanoic acid used as an internal standard.

Atomic Force Microscopy - LPS droplets were deposited on freshly cleaved mica surfaces at room temperature. Samples were imaged with a Nanoscope V Multimodal 8 apparatus (Bruker AXS, Santa Barbara, CA, USA) with a force modulation setup. Piezoelectric scanners (15 µm range) were used in the contact force mode, with scan rates of 1 Hz in association with silicon nitride (Si₃N₄) cantilevers (Nanoprobes NPS, Bruker AXS, Santa Barbara, CA). The nominal imaging force during scanning was ~15.8 nN (k=0.06-0.56 N/m). All reported images were made with 512x512 pixel definition.

Transmission Electron Microscopy - LPS solutions were stained with either 3% phosphotungstic acid or ammonium heptamolybdate, washed by centrifugal filtration, and applied onto a collodion-coated microscope cover grid. Dried samples were imaged with a Hitachi H7500 energy filtering transmission electron microscope (Hitachi, Bron, France) operating at 80 kV. Digital images were recorded with an Advantage CCD camera driven with AMT software (AMT Imaging, Danvers, MA,

USA). All reported images were made with 1024x1024 pixel definition.

Size distribution and zeta potential measurements - Both parameters were determined by using a Malvern Zetasizer Nano ZS device (Malvern, UK). LPS samples in saline were poured into folded capillaries for analysis at a constant temperature of 25°C. Particle size distribution was determined with the dynamic light scattering mode (DLS) over a 0.6 – 6000 nm size range. Briefly, samples were illuminated by a 633-nm helium–neon laser, and the scattered light was measured at a backscatter angle of 173° using an avalanche photodiode. Zeta potential, *i.e.* electronic charge at the slipping plane surrounding the particles in aqueous solutions was measured with the electrophoretic light scattering mode (zetametry) by determining particle mobility in solutions when subjected to an electric field (70mV). Raw DLS and zetametry data were analysed and interpreted with the Malvern software.

Steady-state fluorescence of pyrene probes - The hydrophobicity of LPS aggregates was determined by using the pyrene fluorescence peak I to peak III ratio method. Briefly, an apyrogenic phosphate-buffered saline saturated with the pyrene probe (Sigma Aldrich) was filtered and added to LPS solution in saline (final LPS concentration, 20 µmol/L), and fluorescence was measured at room temperature on an LS50B spectrofluorometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Pyrene emission fluorescence spectra were scanned from 350 to 400 nm with an excitation wavelength of 335 nm. The hydrophobic ratio was calculated by dividing the intensity of first fluorescence peak (peak I - 374 nm) by that of the third peak (peak III - 384 nm). Hydrophobicity correlates inversely with the I to III ratio.

Animals - Wild-type, C57BL/6J littermate mouse females were purchased from Charles River. The mice were fed a standard chow diet (A03 diet; SAFE, Augy, France) and had free access to food and water. All experiments were performed in accordance with institutional guidelines and approved by the Ethics Committee of the University of Burgundy (Protocol number 2511).

LPS injection and sampling - LPS preparations were injected intravenously via the tail vein (200µl at 20µmol/L; single dose) and

blood was collected at the indicated times by retroorbital puncture into endotoxin-free, heparin-containing tubes. After 24 hours, the animals were killed by cardiac puncture and the organs were snap-frozen in liquid nitrogen. Plasma was obtained from blood samples (10 min, 2000 x g at 4°C). All samples were stored at -80°C until further analysis.

Cytokine measurements – Interleukin (IL) 6, IL-10, tumour necrosis factor alpha (TNF- α), macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interferon gamma (IFN- γ) in mouse plasma were assayed by cytometric bead array (CBA) using commercially available kits (CBA mouse inflammation kit, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Signal quantification was performed on a Guava EasyCyte Plus flow cytometer (Millipore, Billerica, MA, USA) and analysed with FCAP Array software (SoftFlow, Pecs, Hungary).

Statistical analyses - Results are expressed as mean \pm S.E. The statistical significance of differences between two data means was determined with the nonparametric Mann-Whitney U-test. P-values under 0.05 were considered significant and are indicated with an asterisk.

RESULTS

Smooth and rough LPS form aggregates of different shapes - In the first step, we determined whether the length of the LPS polysaccharide chain could affect the structure of aggregates *in vitro*. To this end, smooth and rough LPS were dissolved in saline at identical concentrations (20 μ mol/L) and were first analysed by atomic force microscopy (Figure 1). Both LPS solutions contained aggregates. They were apparently homogeneous in each preparation, but differed markedly from one LPS type to the other. Smooth LPS formed small, simple globular aggregates with an apparent diameter ranging from 20 to 30 nm (Fig 1A). Rough LPS formed larger aggregates (apparent diameter, 100-200 nm) that had a spherical to multilobular shape (Fig 1B).

As shown in figure 2, transmission electron microscopy (TEM) observations of smooth and rough LPS solutions (concentration ranging from 15 to 22 μ mol/L) after negative staining confirmed the different sizes and shapes of the

aggregates formed by the two compounds. Consistent results were obtained with phosphotungstic acid (Fig2A, 2C) and ammonium molybdate (Fig2B, 2D) staining techniques. In addition, both staining techniques revealed that smooth LPS aggregates formed homogeneous, dense micelle-like structures (Fig2A, 2C), while rough LPS appeared to form diffuse uni- or multilamellar vesicles (Fig2B, 2D).

Smooth and rough LPS form aggregates with different physical properties and stability - Smooth and rough LPS were solubilized in saline at a final concentration of 20 μ mol/L, similar to the concentration used for atomic force microscopy, in order to get further insights into the physical properties of the aggregates formed with the two compounds. The parameters studied were hydrodynamic size, hydrophobicity, and zeta potential.

Hydrodynamic size was determined by dynamic light scattering (Fig 3A). In solution, both smooth and rough LPS produced single peaks with near-Gaussian distribution, indicating that each compound formed a mostly homogeneous aggregate population. As expected from microscopy analyses (Figure 5 and figure 6), smooth LPS aggregates in solution were clearly smaller than rough LPS aggregates, with mean hydrodynamic peaks at 24.4 and 91.3 nm, respectively (Fig 3A).

Aggregate hydrophobicity was assessed by steady state fluorescence using a non-polar pyrene probe. As shown in figure 3B, the ratio of peak I to peak III fluorescence intensities was significantly lower for rough LPS than for smooth LPS (0.963 ± 0.007 versus 1.070 ± 0.010 ; respectively; $P < 0.05$). This indicates that the microenvironment within the aggregates is more hydrophobic with rough LPS than with smooth LPS.

Zeta potential values, which represent the electric charges at the periphery of the aggregates in suspension, were measured by electrophoretic light scattering. As shown in figure 3C, smooth and rough LPS-derived aggregates gave values of -14.2 ± 0.9 mV and -33.0 ± 2.1 mV, respectively ($P < 0.05$). This indicates that repulsion forces of aggregates containing rough LPS are greater than those of aggregates containing smooth LPS.

Finally, critical aggregation concentrations (CAC) of the two LPS types were analysed as an additional indicator of aggregability. The formation of aggregates with smooth and rough LPS was monitored by dynamic light scattering, using increasing concentrations in a saline solution. As shown in figure 4, aggregates of smooth LPS (Fig 4A) appeared to be more stable than aggregates of rough LPS (Fig 4B), with CAC values of 1.3 and 2.7 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Pro-inflammatory potential of rough LPS is lower than that of smooth LPS in mice - Identical amounts of smooth or rough LPS aggregates (200 μL at 20 $\mu\text{mol/L}$) were injected into mice in order to follow the kinetics of the inflammatory response *in vivo* over 24 hours. As shown in figure 5, both smooth and rough LPS were able to elicit substantial cytokine production with maximal levels observed between 1 and 6 hours after injection (Fig 6A-E, left panels). However, for all of the cytokines studied, the kinetic curves obtained with rough LPS were constantly below those obtained with smooth LPS, resulting in significantly lower AUCs over the 24-hour period (Fig 6A-E, right panels), with 73%, 52%, 44%, 67%, and 86% lower values for IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C), MCP-1 (D), and IFN- γ (E), respectively ($P < 0.05$ in all cases). Overall, in mice, the inflammatory response induced by rough LPS was lower in magnitude and shorter in duration than that induced by smooth LPS.

Smooth and rough LPS show distinct kinetics for plasma and tissue distribution in mice - Since the pro-inflammatory potency of rough LPS is markedly lower than that of smooth LPS *in vivo*, we aimed to determine whether these molecules displayed different bioavailability patterns in mice. Mice were intravenously injected with identical amounts of either smooth or rough LPS (200 μL of 20 $\mu\text{mol/L}$ solutions), and the plasma kinetics of LPS clearance was assessed by measuring LPS concentration through direct quantitation of 3HM (a direct quantitation of the lipid A moiety of both rough and smooth LPS) over 24 hours. For smooth LPS, and as shown in Figure 6A, a single injection led to high levels of 3HM at the 1-hour time point. This was followed by a progressive decrease over the period studied. However, substantial amounts (37% of the levels that were detected at the first blood draw after injection) were still present in the circulation at

24 hours (Fig 6A, closed diamonds). For rough LPS, and in contrast to smooth LPS, only trace amounts of 3HM were measured over the 24-hour period (Fig 6A, open squares), with a plasma AUC that was far lower for rough LPS than for smooth LPS (Fig 6B, $P < 0.05$).

In order to determine the tissue fate of both types of LPS, mice were injected with saline or equal amounts of either smooth or rough LPS; they were killed 3 hours or 24 hours after injection, and LPS levels were measured in the liver, kidneys and lungs. As shown in figure 7A, high amounts of rough LPS accumulated in the liver as early as 3 hours after injection. In contrast, smooth LPS was found at low levels in this organ at the same time point, with values that were 87% lower than for rough LPS ($P < 0.05$; Fig 7A, left). Twenty-four hours after injection, rough LPS levels in the liver were higher than smooth LPS levels (-54%, $P < 0.05$; Fig 7A, right). Finally, only trace amounts of either smooth or rough LPS could be detected in the kidneys (Fig 7B) or lungs (Fig 7C) of injected mice.

DISCUSSION

Better understanding of the parameters that influence LPS toxicity, inactivation and clearance is crucial to set up new strategies aimed at controlling the inflammatory burst in septic patients. Such factors have been a matter of intense research. Since the lipid A moiety is the endotoxic principle which interacts directly with the TLR4-MD2 complex, this part of the LPS molecule has been the main focus of attention, especially regarding fatty acid composition and phosphorylation (6, 25-28). In addition to the lipid A structure itself, the physicochemical properties of LPS aggregates may influence lipid A availability for cellular receptors, *in vivo* pharmacokinetics, and eventually the pro-inflammatory effects (9, 14, 18, 22-25, 30-31). Although these aspects might be dependent on the nature of the oligosaccharide chain, the physicochemical and biological properties of LPS with identical lipid A moieties but distinct chains have not yet been studied concomitantly.

In the present study, we compared two LPS molecules with identical lipid A and inner core moieties, but with different polysaccharide chain lengths. We showed that, when used at identical molar concentrations, smooth LPS has a

significantly higher pro-inflammatory potency than rough LPS *in vivo* (Fig 5).

It should be emphasized that the LPS preparations were injected into mice as aggregates since the preparations were at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, clearly above the CAC value (present study, 19). This indicates that the differences observed were linked to the structural features and/or pharmacokinetics of the aggregates. In support of this view, physicochemical analyses showed that aggregates of smooth and rough LPS displayed totally different structural characteristics, the most obvious being the size. As observed by electron transmission microscopy and atomic force microscopy, aggregates of smooth LPS were five to ten times smaller than aggregates of rough LPS. These observations were confirmed by DLS analysis of aggregates in saline solution, with a mean size of 24.4 and 91.3 nm for smooth and rough LPS, respectively. These values are consistent with those reported by others and show that, depending on the technique used (32,33) smooth LPS form aggregates with a diameter between 10 and 50 nm (17,34,35) while rough LPS aggregates show a diameter ranging between 50 and 100 nm (10,20,36,37). Of note, our study is the first to compare the aggregate size of LPS molecules from the same bacterial species with identical lipid A and inner core moieties, but differing in the polysaccharide chain length only. Consequently, it highlights and for the first time that polysaccharide chain length is a major determinant of the size of LPS aggregates. In earlier studies, large (12-14) or small (15) aggregates were associated with a greater inflammatory potential. In contrast, others reported no relationship between aggregate size and inflammatory potential (16,17), suggesting in this case that, if the LPS molecular structure is an important determinant of its proinflammatory potential, it is unlikely because of aggregate size. It must be remembered, however, that circulating aggregates or bacterial blebs, rather than free LPS monomers, have been recognized as the active form of LPS in aqueous media (12,14). Thus, it remains that various structural and/or pharmacokinetic features might actually modulate the pro-inflammatory activity of LPS aggregates.

Our data indicate that aggregates of rough LPS display multilobular / multilamellar

structures while smooth LPS aggregates display simpler, spheroidal aggregates (Figure 1, and 2). These structural specificities most likely reflect the differences in LPS behaviour in an aqueous environment, given that the amphipathic nature of these molecules determines their ability to form aggregates in solutions (10). Because smooth LPS contains a large hydrophilic moiety, it was able in the present study to produce aggregates with a low hydrophobicity index and with high stability in the aqueous phase. Accordingly, we found a CAC value for smooth LPS that was half that of rough LPS (Figure 4). This view regarding CAC adds to earlier studies, which showed that LPS species with a long polysaccharide chain have a CMC/CAC value around 1 $\mu\text{mol/L}$ while LPS with a short polysaccharide chain have a CMC/CAC value closer to 5 $\mu\text{mol/L}$ (19,35,37). Finally, the hypothesis that rough LPS forms less stable aggregates is further sustained by zeta potential data of the present study reflecting the repulsion forces (17,38-41).

The pathophysiological value of physico-chemical analyses could be ascertained in the present study through an *in vivo* pharmacokinetics study. Again, as observed *in vitro*, the findings suggested that rough LPS formed less stable aggregates. Indeed, whereas smooth LPS produced a substantial initial peak in mouse plasma followed by a slow decay over the 24-hour period, rough LPS was barely detectable over the period studied. This suggests that the more unstable rough LPS aggregates are rapidly cleared, as they quickly accumulated in the liver, as early as 3 hours after injection, whereas smooth LPS accumulated in the liver at a much slower rate. Of note, neither smooth nor rough LPS accumulated in kidneys or lungs indicating that both compounds follow the same, liver-specific clearance pathway. This finding brings new support for a reverse lipopolysaccharide transport pathway that was recently deciphered and imaged (RLT, 23,42). The more rapid clearance of rough LPS from the circulation by the liver, as reported in the present study, is a cogent explanation to the reduced inflammatory response it elicited as compared to smooth LPS.

Taken together, our structural and kinetic data indicate that large aggregates of rough LPS are less stable than small aggregates of smooth LPS in aqueous media, and are thus more rapidly

LPS structure, aggregability and in vivo behaviour

cleared from the circulation. This proposal challenges the hypothesis that large aggregates are unable to pass through vascular fenestrae and be eliminated (43,44).

These findings bring new insights into the LPS features that account for its pharmacokinetics, clearance and finally inflammatory properties when injected as a purified extract *in vivo*. Because the injection of LPS preparations is commonly used to trigger

inflammation in the laboratory, it is proposed that the polysaccharide chain length, zeta potential, and overall aggregability might help to determine or anticipate the proinflammatory effect that can be expected from the LPS of distinct strains. In addition, better knowledge of LPS aggregation and disaggregation might be helpful in setting up new strategies to enhance the RLT pathway and to resolve inflammation.

REFERENCES

1. Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169-176
2. Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., and Kuiper, J. (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 379-414
3. Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700
4. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway C.A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397
5. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777-1782
6. Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H., and Lee, J.O. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191-1195
7. Tobias, P.S., Soldau, K., Gegner, J.A., Mintz, D., and Ulevitch, R.J. (1995) Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J. Biol. Chem.* **270**, 10482-10488
8. Miyake, K. (2006) Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* **12**, 195-204
9. Brandenburg, K., Andrä, J., Müller, M., Koch, M.H., and Garidel, P. (2003) Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr. Res.* **338**, 2477-2489
10. Sasaki, H., and White, S.H. (2008) Aggregation behavior of an ultra-pure lipopolysaccharide that stimulates TLR-4 receptors. *Biophys. J.* **95**, 986-993
11. Gioannini, T.L., Teghanemt, A., Zhang, D., Coussens, N.P., Dockstader, W., Ramaswamy, S., and Weiss, J.P. (2004) Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4186-4191
12. Mueller, M., Lindner, B., Dedrick, R., Schromm, A.B., and Seydel, U. (2005) Endotoxin: physical requirements for cell activation. *J. Endotoxin Res.* **11**, 299-303
13. Shnyra, A., Hultenby, K., and Lindberg, A.A. (1993) Role of the physical state of *Salmonella* lipopolysaccharide in expression of biological and endotoxic properties. *Infect. Immun.* **61**, 5351-5360
14. Mueller, M., Lindner, B., Kusumoto, S., Fukase, K., Schromm, A.B., and Seydel, U. (2004) Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* **279**, 26307-26313
15. Vukajlovich, S.W., and Morrison, D.C. (1983) Conversion of lipopolysaccharides to molecular aggregates with reduced subunit heterogeneity: demonstration of LPS-responsiveness in "endotoxin-unresponsive" C3H/HeJ splenocytes. *J. Immunol.* **130**, 2804-2808
16. Kitchens, R.L., and Munford, R.S. (1998) CD14-dependent internalization of bacterial lipopolysaccharide (LPS) is strongly influenced by LPS aggregation but not by cellular responses to LPS. *J. Immunol.* **160**, 1920-1928
17. Hardy, E., Kamphuis, T., Japaridze, A., Wilschut, J.C., and Winterhalter, M. (2012) Nanoaggregates of micropurified lipopolysaccharide identified using dynamic light scattering, zeta potential measurement, and TLR4 signaling activity. *Anal. Biochem.* **430**, 203-213
18. Wilkinson, S.G. (1996) Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. *Prog. Lipid. Res.* **35**, 283-343
19. Aurell, C.A., and Wistrom, A.O. (1998) Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 119-123
20. D'Errico, G., Silipo, A., Mangiapia, G., Vitiello, G., Radulescu, A., Molinaro, A., Lanzetta, R., and Paduano, L. (2010) Characterization of liposomes formed by lipopolysaccharides from *Burkholderia*

- cenocepacia, Burkholderia multivorans and Agrobacterium tumefaciens: from the molecular structure to the aggregate architecture. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13574-13585
21. Munford, R.S., Hall, C.L., and Dietschy, J.M. (1981) Binding of Salmonella typhimurium lipopolysaccharides to rat high-density lipoproteins. *Infect. Immun.* **34**, 835-843
 22. Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-1431
 23. Gautier, T., and Lagrost, L. (2011) Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 984-988
 24. Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.L., Paul, C., Le Guern, N., Athias, A., Montange, T., Monier, S., Piard, F., Jiang, X.C., Masson, D., and Lagrost, L. (2008) Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 18702-18710
 25. Qureshi, N., Takayama, K., and Ribí, E. (1982) Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. *J. Biol. Chem.* **257**, 11808-11815
 26. Brandenburg, K., Lindner, B., Schromm, A., Koch, M.H., Bauer, J., Merkli, A., Zbaeren, C., Davies, J.G., and Seydel, U. (2000) Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM-174 in relation to biological activity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3370-3377
 27. Seydel, U., Hawkins, L., Schromm, A.B., Heine, H., Scheel, O., Koch, M.H., and Brandenburg, K. (2003) The generalized endotoxic principle. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1586-1592
 28. Tanimura, N., Saitoh, S., Ohto, U., Akashi-Takamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Shimizu, T., and Miyake, K. (2014) The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int. Immunol.* **26**, 307-314
 29. Kitchens, R.L., Wolfbauer, G., Albers, J.J., and Munford, R.S. (1999) Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J. Biol. Chem.* **274**, 34116-34122
 30. de Haas, C.J., van Leeuwen, H.J., Verhoef, J., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2000) Analysis of lipopolysaccharide (LPS)-binding characteristics of serum components using gel filtration of FITC-labeled LPS. *J. Immunol. Methods.* **242**, 79-89
 31. Gautier, T., Paul, C., Deckert, V., Desrumaux, C., Klein, A., Labbé, J., Le Guern, N., Athias, A., Monier, S., Hammann, A., Bettaieb, A., Jeannin, J.F., and Lagrost, L. (2010) Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.* **24**, 3544-3554
 32. Brogden, K.A., and Phillips, M. (1988) The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. *Electron. Microsc. Rev.* **1**, 261-278
 33. Richter, W., Vogel, V., Howe, J., Steiniger, F., Brauser, A., Koch, M.H., Roessle, M., Gutschmann, T., Garidel, P., Mäntele, W., and Brandenburg, K. (2011) Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immun.* **17**, 427-438
 34. Risco, C., Carrascosa, J.L., and Bosch, M.A. (1993) Visualization of lipopolysaccharide aggregates by freeze-fracture and negative staining. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. **42**, 202-204
 35. Bergstrand, A., Svanberg, C., Langton, M., and Nydén, M. (2006) Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from Escherichia coli O55:B5. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **53**, 9-14
 36. Aurell, C.A., Hawley, M.E., and Wiström, A.O. (1999) Direct visualization of gram-negative bacterial lipopolysaccharide self-assembly. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **2**, 42-46
 37. Santos, N.C., Silva, A.C., Castanho, M.A., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. (2003) Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy. *Chembiochem.* **4**, 96-100
 38. Domingues, M.M., Inácio, R.G., Raimundo, J.M., Martins, M., Castanho, M.A., and Santos, N.C. (2012) Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers* **98**, 338-344

39. Singh, S., Papareddy, P., Kalle, M., Schmidtchen, A., and Malmsten, M. (2013) Importance of lipopolysaccharide aggregate disruption for the anti-endotoxic effects of heparin cofactor II peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 2709-2719
40. Velkov, T., Deris, Z.Z., Huang, J.X., Azad, M.A., Butler, M., Sivanesan, S., Kaminskas, L.M., Dong, Y.D., Boyd, B., Baker, M.A., Cooper, M.A., Nation, R.L., and Li, J. (2014) Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun.* **20**, 350-363
41. Lyklema, J. (1991) *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.
42. Duheron, V., Moreau, M., Collin, B., Sali, W., Bernhard, C., Goze, C., Gautier, T., Pais de Barros, J.P., Deckert, V., Brunotte, F., Lagrost, L., and Denat, F. (2014) Dual labeling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy. *ACS Chem. Biol.* **9**, 656-662
43. Braet, F., and Wisse, E. (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* **1**, 1
44. Salmon, A.H., Neal, C.R., and Harper, S.J. (2009) New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three. *Curr Opin Nephrol. Hypertens.* **18**, 197-205

Acknowledgements - We thank Philip Bastable for editing this article.

FOOTNOTES

*This work was supported by the INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), the Regional Council of Burgundy, the University of Burgundy, the Fondation de France and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d'Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx.

¹To whom correspondence should be addressed : Thomas Gautier, Ph.D - Centre de Recherche INSERM UMR866, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc - BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France.

²The abbreviations used are: LPS, lipopolysaccharide(s); CD14, cluster of differentiation 14; TLR, Toll-like receptor; MD2, myeloid differentiation factor 2; LCMS², liquid chromatography / tandem mass spectrometry; IL, interleukin; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IFN γ , interferon gamma; MCP-1, macrophage chemoattractant protein 1; CBA, cytometric bead array; TEM, transmission electron microscopy; CAC, critical aggregation concentration; CMC, critical micellar concentration; DLS, dynamic light scattering; 3HM, 3-hydroxymyristate.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Atomic force microscopy shows that rough LPS forms larger aggregates than smooth LPS. Saline solutions containing 20 $\mu\text{mol/L}$ of smooth (A, B) or rough LPS (C) were analysed with an atomic force microscope (See “Experimental Procedures” for additional experimental details). Panel A is a representative view of small-sized aggregates of smooth LPS. Panel B is a representative view of large-sized aggregates of rough LPS.

FIGURE 2. Transmission electron microscopy after negative staining shows multilamellar vesicles formed by rough LPS and small aggregates formed by smooth LPS. Saline solutions containing smooth LPS (A and B, 15 $\mu\text{mol/L}$) or rough LPS (C, 22 $\mu\text{mol/L}$ and D, 15 $\mu\text{mol/L}$) were analysed with a transmission electron microscope after staining with phosphotungstic acid (A, C; black bars, 100 nm) or ammonium molybdate (B, D; black bars, 50 nm) (See “Experimental Procedures” for additional experimental details). Pictures are representative of several independent experiments.

FIGURE 3. Size distribution, zeta potential and hydrophobicity index of structures formed by smooth and rough LPS. Size distribution of smooth LPS (closed diamonds) and rough LPS (open squares) in saline was determined by dynamic light scattering (A). Hydrophobicity index (B) and zeta potential (C) of smooth (black bars) and rough LPS (grey bars) was determined by spectrofluorimetry using a pyrene probe and by zetametry, respectively. See “Experimental Procedures” for additional experimental details. Bars are mean \pm SE of quadruplicate measurements. * significantly different from smooth LPS, $P < 0.05$. All panels are representative of three distinct experiments.

FIGURE 4. Rough LPS has a higher critical aggregation concentration than smooth LPS. Critical aggregation concentration (CAC) of smooth LPS (A) and rough LPS (B) in saline was calculated after plotting aggregate size (as determined by dynamic light scattering) against LPS concentration. For both LPS, aggregation profiles were distributed along two linear regression curves (dotted lines). The CAC corresponds to the intersection (arrows) of the two linear curves, below which aggregates start to decrease in size. See “Experimental Procedures” for additional experimental details.

FIGURE 5. Rough LPS elicits a weaker inflammatory response than smooth LPS *in vivo*. Wild-type C57BL/6 mice were intravenously injected with 200 μL of pyrogen-free saline containing either rough

strain LPS (*i.e.* with a short polysaccharide chain) and smooth strain LPS (*i.e.* with a long polysaccharide chain) (20 $\mu\text{mol/L}$ each). Blood was collected at the indicated times, and plasma levels of proinflammatory cytokines/chemokines (IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C), MCP-1 (D), and IFN- γ (E)) were measured by cytometric bead array. Plasma kinetics (left panel) and area under the curve (AUC – right panel) as calculated over the 24-hour period are displayed for each cytokine/chemokine in mice injected with smooth LPS (closed diamonds, black bars, $n=8$) or rough LPS (open squares, grey bars, $n=8$). In all cases, smooth LPS induced higher cytokine/chemokine production compared to rough LPS. Error bars, S.E. * significantly different from smooth LPS, $P<0.05$. Data are representative of three comparable experiments. See “Experimental Procedures” for additional experimental details.

FIGURE 6. Smooth LPS, unlike rough LPS, has a long residence time in mouse plasma. Wild-type C57BL/6 mice were intravenously injected with 200 μL of pyrogen-free saline containing either smooth or rough LPS (20 $\mu\text{mol/L}$ each). Blood was collected by retroorbital puncture before injection (time 0) and 1, 3, 6 and 24 hours after injection. Plasma levels of smooth and rough LPS were determined by direct quantitation of 3-hydroxymyristate (3HM) as described in “Experimental procedures”. Panel A shows plasma kinetics of smooth LPS (closed diamonds, $n=8$) and rough LPS (open squares, $n=8$) over a 24-hour time period. Panel B, LPS area under the curve (AUC) in total plasma was calculated from kinetic curves measured over 24 h in panel A (black bars, smooth LPS; grey bars, rough LPS).

FIGURE 7. Rough LPS accumulates more rapidly in mouse liver than does smooth LPS. Wild-type C57BL/6 mice were intravenously injected with 200 μL of pyrogen-free saline alone (white bars, background) or saline containing either smooth (black bars) or rough (grey bars) LPS (20 $\mu\text{mol/L}$ each). Mice were killed by heart puncture 3 hours or 24 hours after injection ($n=4$ for each group and each time point) and liver, kidneys and lungs were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before further analysis. After homogenization, tissue levels of smooth and rough LPS were determined in the liver (A), kidney (B) and lung (C) by direct quantitation of 3-hydroxymyristate (3HM) as described in “Experimental procedures”. Data are mean \pm SE. ^a significantly different from background; ^b significantly different from smooth LPS, $P<0.05$. See “Experimental Procedures” for additional experimental details.

Table of contents

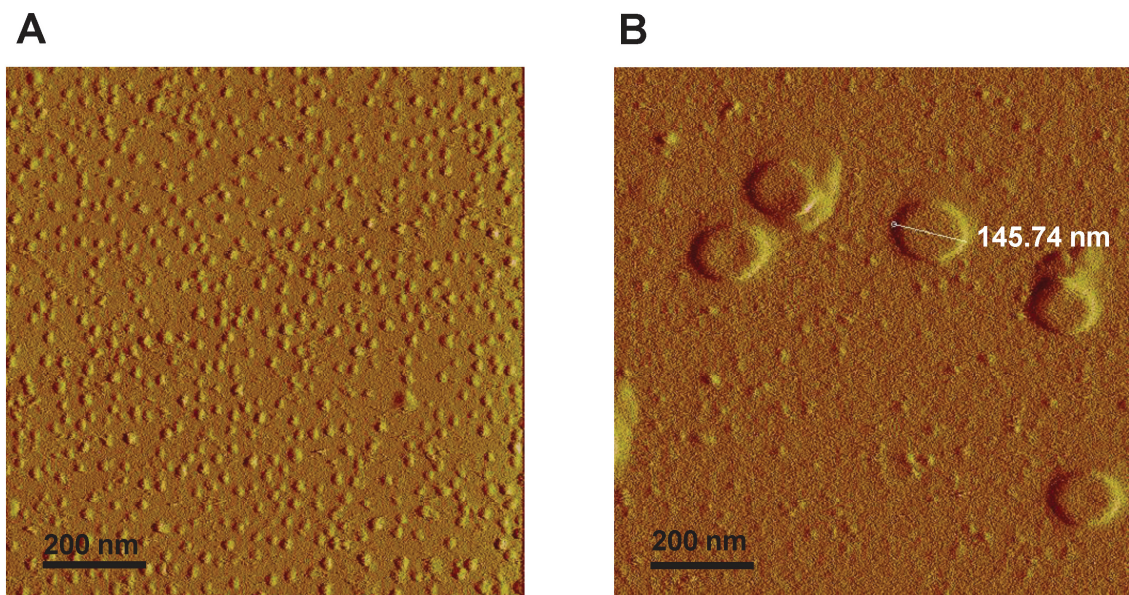
Figure 1 *Sali et al.*

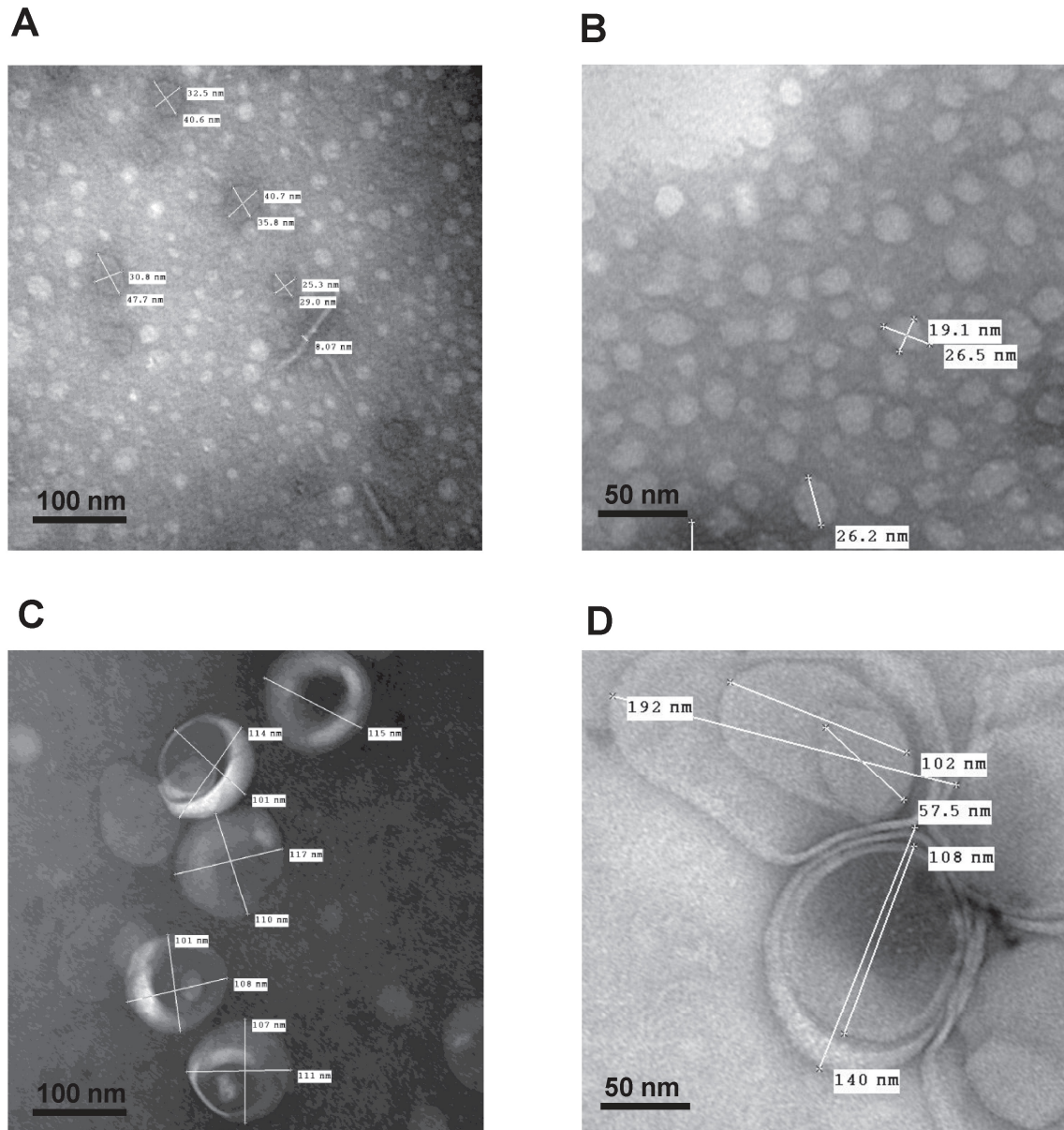
Figure 2 *Sali et al.*

Figure 3 Sali et al.

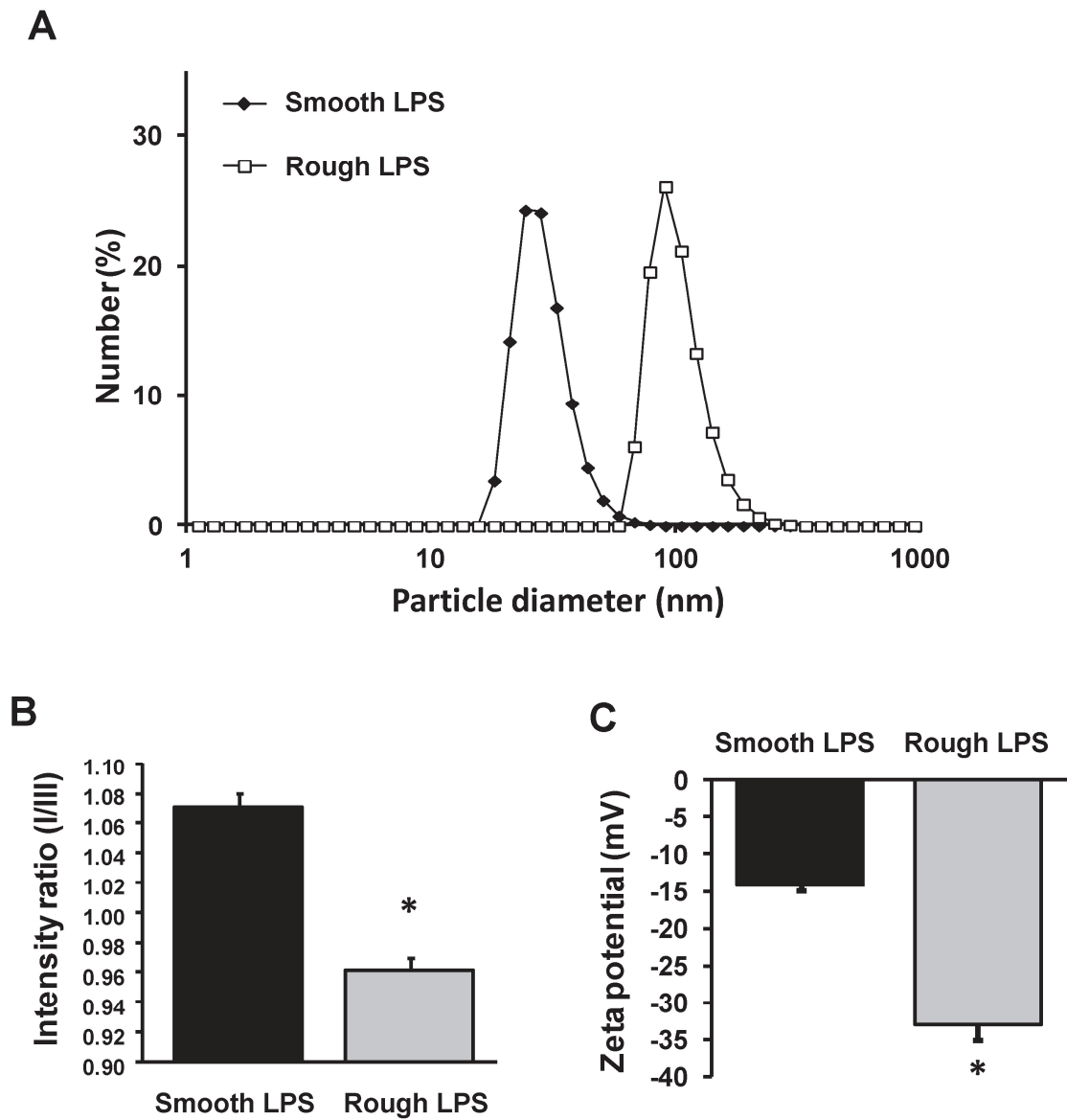


Figure 4 Sali et al.

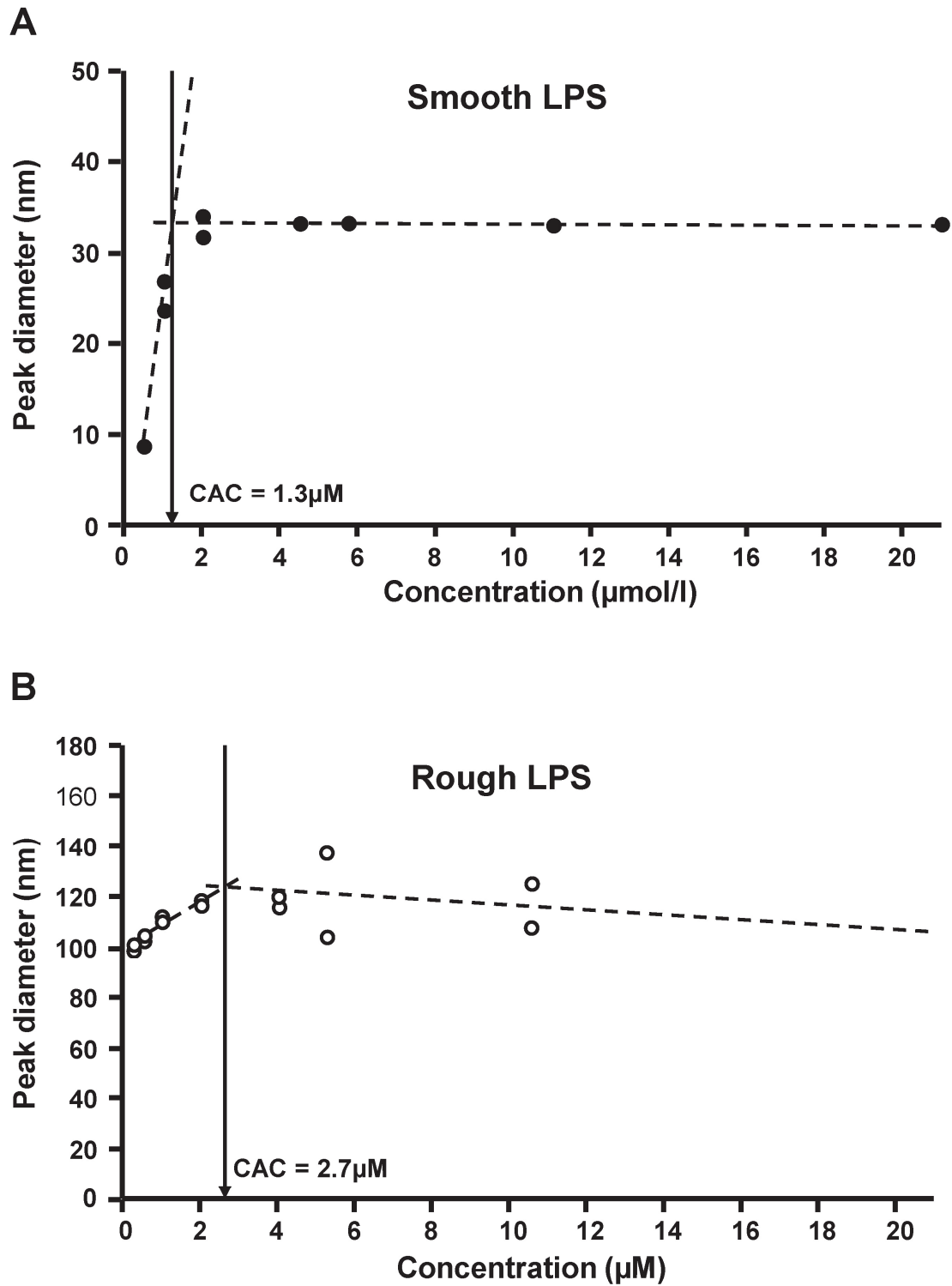


Figure 5
Sali et al.

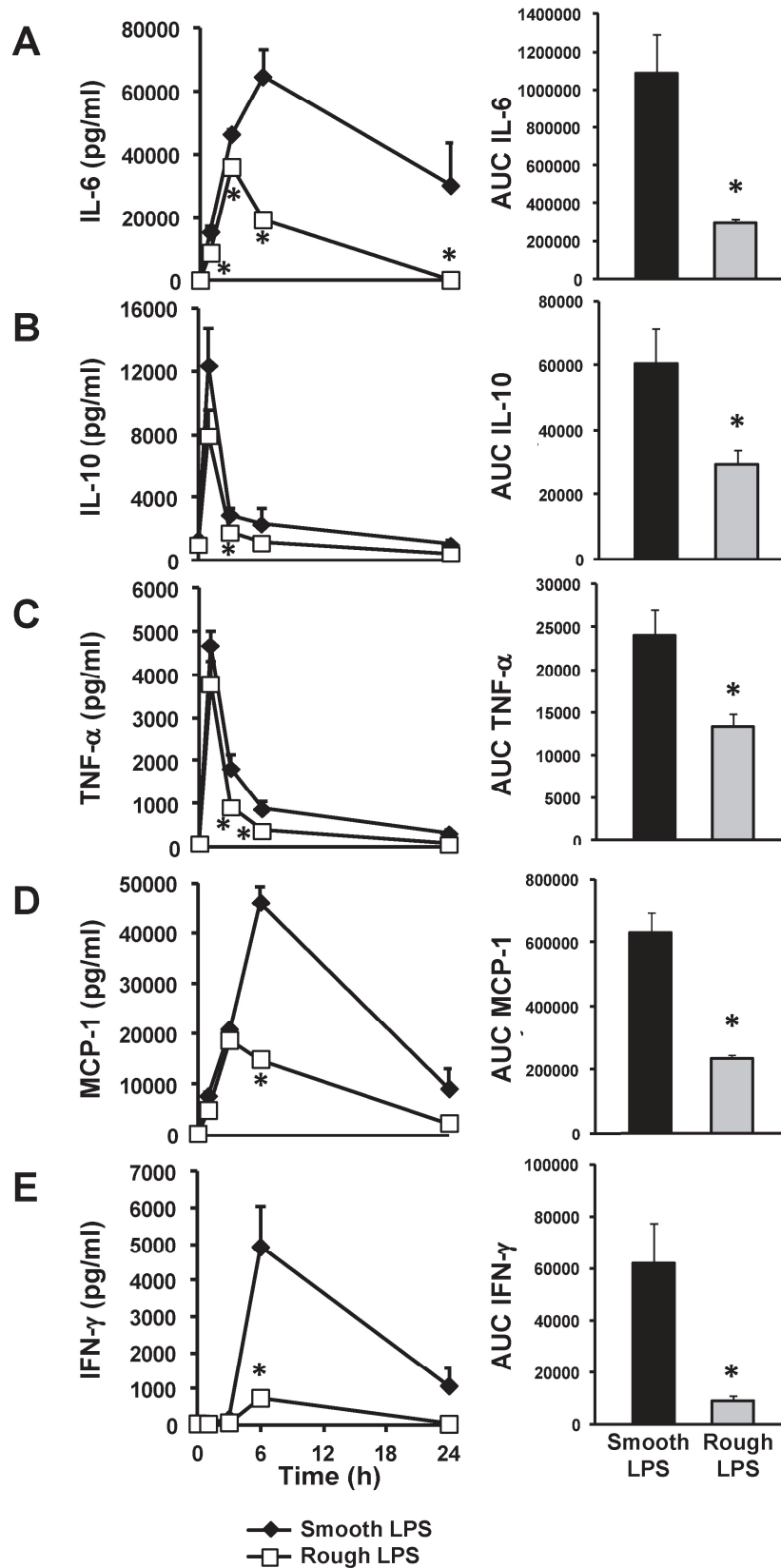


Figure 6 Sali et al.

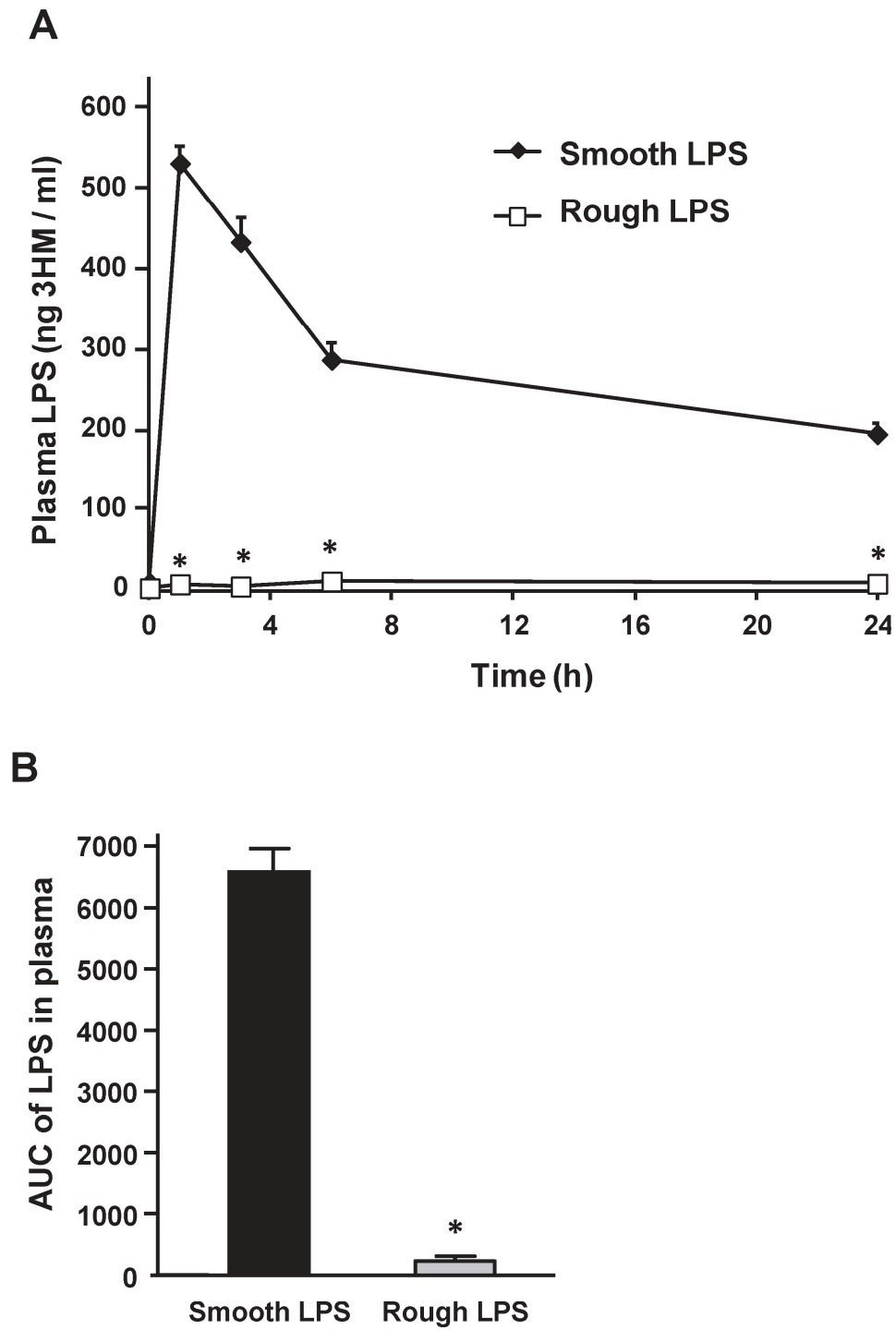
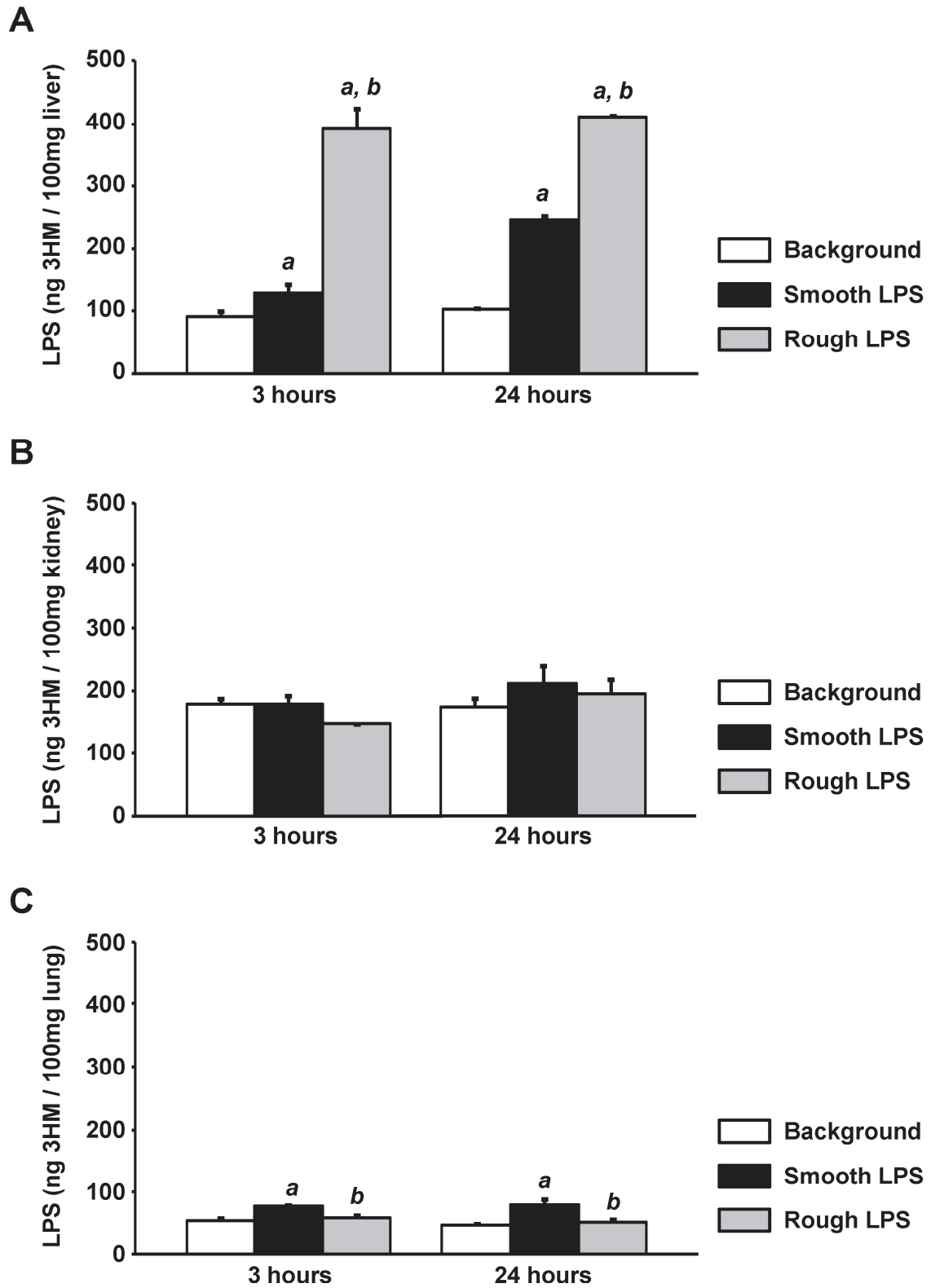


Figure 7 Sali et al.



III. Article n°3 : Dual labelling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy

Fiche introductive	<p>Introduction</p> <p>L'étude intégrale du métabolisme du LPS nécessitait jusque-là d'avoir recours successivement à différentes approches. Les unes mettant en œuvre des LPS radiomarqués et les autres faisant intervenir des LPS marqués par fluorescence. Quand bien même les LPS utilisés comme base de marquage sont identiques, cette méthodologie séquentielle est particulièrement sujette au manque de reproductibilité entre les expériences de radioactivité et celles de fluorescence. Cette variabilité rend délicate la comparaison et l'association des informations obtenues par le biais de ces deux techniques pourtant complémentaires.</p>
	<p>Développer et valider une technique de marquage bimodal du LPS, qui affranchisse l'expérimentateur des limites de la méthodologie séquentielle sus-mentionnée</p>
	<p>Méthodologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Conjugaison entre DOTA-Bodipy-NCS et LPS, purification des LPS conjugués, validation de la conjugaison et de la conservation des propriétés biologiques des LPS conjugués. - Radiomarquage des LPS-DOTA-Bodipy avec de l'indium-111 (^{111}In) et sa validation. - Suivi en temps réel de la radioactivité par SPECT-CT sur des souris injectées avec les LPS-DOTA-Bodipy radiomarqué ^{111}In. - Observation par microscopie confocale de la fluorescence dans le foie et la rate des souris injectées avec les LPS-DOTA-Bodipy radiomarqué ^{111}In.
	<p>Résultats</p> <p>Le marquage bimodal des LPS a été validé comme un marquage rapide, pratique, efficace et conservant les propriétés d'agrégation et pro-inflammatoires des LPS.</p> <p>Ce marquage nous a permis de mettre en évidence l'élimination hépatique des LPS par internalisation dans les cellules hépatiques.</p>
	<p>Conclusion</p> <p>Le marquage bimodal permet de suivre chez chaque individu de la population étudiée, suite à une unique injection, la cinétique des LPS dans l'organisme hôte et leur biodistributions tissulaire et cellulaire. Ce double marquage permet de profiter de la sensibilité de l'imagerie radioactive et de l'ergonomie de celle par fluorescence. En outre, il permet de comparer et d'associer en toute rigueur les informations obtenues par le biais de la mesure de la fluorescence et celles obtenues par la mesure de la radioactivité. Cette technique a permis de confirmer par visualisation en temps réel, le transport inverse du LPS avec accumulation de celui-ci dans les cellules hépatiques.</p>

Dual Labeling of Lipopolysaccharides for SPECT-CT Imaging and Fluorescence Microscopy

Vincent Duheron,^{†,‡} Mathieu Moreau,[†] Bertrand Collin,^{†,§} Wahib Sali,[‡] Claire Bernhard,[†] Christine Goze,[†] Thomas Gautier,[‡] Jean-Paul Pais de Barros,[‡] Valérie Deckert,[‡] François Brunotte,[§] Laurent Lagrost,^{‡,||} and Franck Denat*,[†]

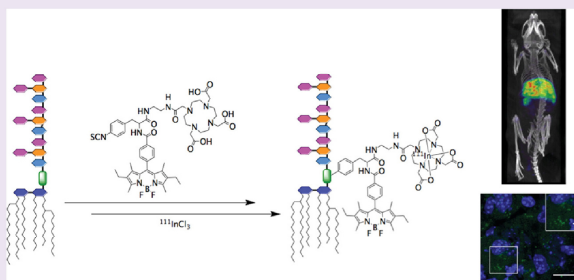
[†]Institute of Molecular Chemistry of the University of Burgundy, UMR CNRS 6302, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

[‡]INSERM Research Center UMR866, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

[§]Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France

^{||}Centre Hospitalier Universitaire, 21000 Dijon, France

ABSTRACT: Lipopolysaccharides (LPS) or endotoxins are amphipathic, pro-inflammatory components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. In the host, LPS can trigger a systemic inflammatory response syndrome. To bring insight into *in vivo* tissue distribution and cellular uptake of LPS, dual labeling was performed with a bimodal molecular probe designed for fluorescence and nuclear imaging. LPS were labeled with DOTA-Bodipy-NCS, and pro-inflammatory properties were controlled after each labeling step. LPS were then radiolabeled with ¹¹¹In and subsequently injected intravenously into wild-type, C57B16 mice, and their *in vivo* behavior was followed by single photon emission computed tomography coupled with X-ray computed tomography (SPECT-CT) and fluorescence microscopy. Time course of liver uptake of radiolabeled LPS (¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS) was visualized over a 24-h period in the whole animal by SPECT-CT. In complementary histological analyses with fluorescent microscopy, the bulk of injected ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS was found to localize early within the liver. Serum kinetics of unlabeled and DOTA-Bodipy-labeled LPS in mouse plasma were similar as ascertained by direct quantitation of β -hydroxymyristate, and DOTA-Bodipy-LPS was found to retain the potent, pro-inflammatory property of the unlabeled molecule as assessed by serum cytokine assays. It is concluded that the dual labeling process, involving the formation of covalent bonds between a DOTA-Bodipy-NCS probe and LPS molecules is relevant for imaging and kinetic analysis of LPS biodistribution, both *in vivo* and *ex vivo*. Data of the present study come in direct and visual support of a lipopolysaccharide transport through which pro-inflammatory LPS can be transported from the periphery to the liver for detoxification. The ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS probe arises here as a relevant tool to identify key components of LPS detoxification *in vivo*.



Lipopolysaccharides (LPS) or endotoxins are components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. In the host, LPS induce leucocyte activation via the LBP/CD14/MD2/TLR pathway thereby triggering inflammation, which is characterized by the release of pro-inflammatory cytokines and a systemic inflammatory response syndrome (SIRS).¹ Alternatively, the inflammatory property of LPS can be neutralized through its binding to plasma lipoproteins. Uptake of lipoprotein-bound LPS by the liver eventually leads to biliary excretion through a multistep, dynamic process, which has been deciphered only recently. Appropriate molecular tools are now required for comprehensive kinetic analysis and imaging of LPS *in vivo*.

Several approaches have been used in earlier studies to label LPS, including labeling with either radionuclides (³H, ¹⁴C, ¹²⁵I, ^{99m}Tc, or ⁵¹Cr),^{2–6} or fluorophores (Fluorescein isothiocyanate (FITC), Alexa488, Bodipy),^{6–8} providing only fragmentary

information on kinetics and biological behavior of LPS. In order to provide a more comprehensive picture, we used in the present study a bimodal agent combining a DOTA (1,4,5,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) radio-metal complex with a fluorescent Bodipy dye.⁹ DOTA derivatives are known to form stable complexes with a large number of metals, including ¹¹¹In. They are extensively used for *in vivo* imaging with SPECT-CT.^{10–13} The bimodal DOTA-Bodipy-NCS probe is able to form a covalent bond with any molecule carrying an amine or hydroxyl reactive function.

In the present study, bimodality was applied to the study of *in vivo* fate (by ¹¹¹In SPECT-CT imaging) and tissue distribution (by confocal microscopy) of LPS into wild-type,

Received: October 10, 2013

Accepted: December 12, 2013



C57B16 mice. It brings new and visual evidence for the liver as a central organ in the detoxification of LPS *in vivo*.

RESULTS AND DISCUSSION

Conjugation of LPS with DOTA-Bodipy-NCS. Mono-molecular multimodality imaging agents (MOMIA) have a high interest in investigating several aspects of the biology of a given molecule. Indeed multimodal probes have mainly relied on nanoparticles or polymeric probes. These tracers, although quite flexible, have severe drawbacks in relation with their size and potential toxicity. On the other hand, MOMIA have a low molecular weight and might impact biological function less than the aforementioned large particles. By combining two different principles of detection, MOMIA offer the opportunity to combine whole body detection and subsequent microscopic detection after the radioactivity has disappeared from the tissues. The present study takes advantage of this potential to highlight the kinetics of LPS in the body. Here, a double, fluorescent plus radiolabeled probe, namely, DOTA-Bodipy-NCS (Figure 1a,b)⁹ was used for the first time. The use of a

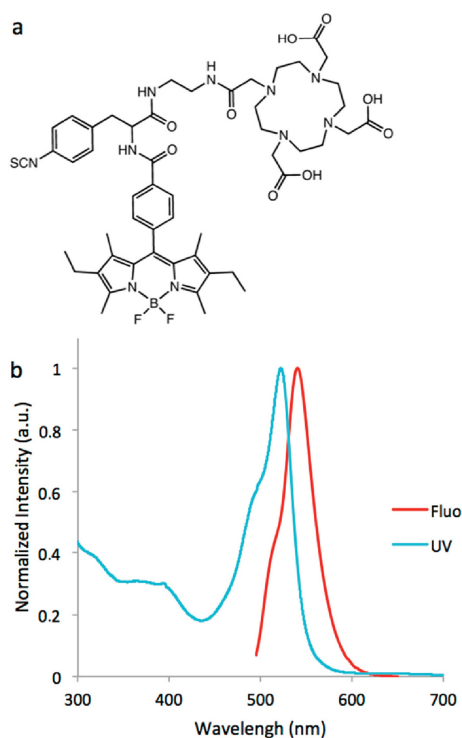


Figure 1. Bodipy-DOTA derivative for bimodal imaging. (a) Structure of the DOTA-Bodipy-NCS. (b) Absorption and emission spectra of the DOTA-Bodipy-NCS in PBS 1X + 10% DMSO. Maximum λ_{abs} : 522 nm. Maximum λ_{em} : 540 nm.

monomolecular bimodal probe combining nuclear modalities (PET or SPECT) and optical imaging ensures identical biodistribution of the two probes.^{14–16} The coupling of DOTA-Bodipy-NCS was performed using slight modifications of previous methods.^{7,17} Indeed, in these previous studies, FITC was grafted on LPS and the product was purified by dialysis or Sephadex. In our case, the DOTA-Bodipy-LPS and the DOTA-Bodipy-NCS cannot be separated by these methods probably due to aggregation of lipophilic Bodipy derivatives.

Satisfactory results can be obtained using high resolution size exclusion chromatography on a fast protein liquid chromatography device (FPLC). As shown in Figure 2a, the bulk of both

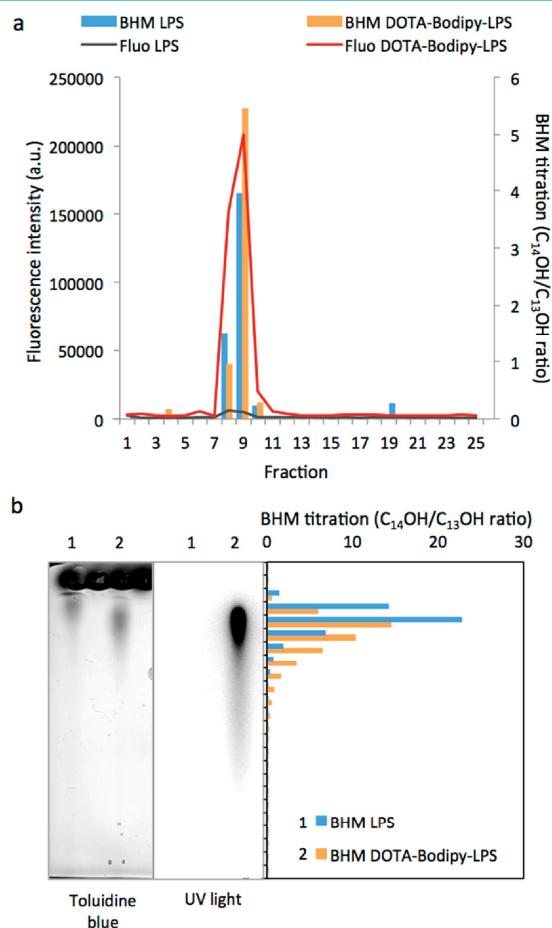


Figure 2. LPS conjugation with DOTA-Bodipy-NCS. (a) After elution through the Superdex75 column, the 1-mL fractions were submitted to fluorescence emission (curves) and BHM titration (columns). (b) LPS migration through 0.5% agarose gel. The gel was first revealed under UV light, then colored with Toluidine blue, and finally cut into pieces for BHM titration. Lane 1: unlabeled LPS; Lane 2: DOTA-Bodipy-LPS. In BHM titration, the ratio represents the amount of BHM (C_{14}OH) recovered after hexane extraction normalized by the internal control (C_{13}OH).

unlabeled LPS and DOTA-Bodipy-LPS eluted in the same FPLC fractions. In native agarose gel electrophoresis, fractions with high fluorescence intensity after UV illumination contained elevated amounts of β -hydroxymyristate (BHM), attesting the presence of LPS in the fractions (Figure 2b). These data come in support of a successful conjugation of the bimodal agent on LPS.

Pro-inflammatory Activity of DOTA-Bodipy-LPS. Detection of LPS by leucocytes triggers an acute inflammatory response known as SIRS. In turn, inflammation contributes to alterations in the levels and kinetics of circulating lipoproteins, which are the natural carriers of LPS in the bloodstream. As shown in Figure 3a, THP-1 macrophage differentiation after PMA (phorbol myristate acetate) treatment was confirmed by

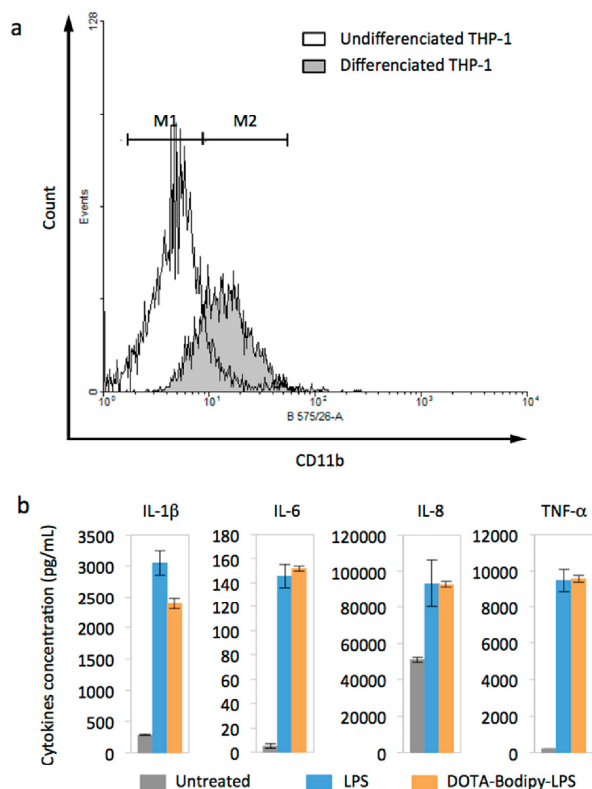


Figure 3. *In vitro* assay for LPS activity after conjugation. (a) FACS analysis of THP-1 differentiation after PMA treatment, using CD11b expression. Before differentiation: M1 = 88.8%; M2 = 11.2%; After PMA treatment: M1 = 24.2%; M2 = 75.8%. (b) Cytokines secreted by THP-1 after LPS stimulation. The data are the average \pm SD of 3 wells/group.

FACS (fluorescence-activated cell sorting) analysis using CD11b expression. As compared to unstimulated THP-1 macrophages with no significant secretion of cytokines, incubation in the presence of either unlabeled LPS or DOTA-Bodipy-LPS induced similar production of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF α (Figure 3b). Most importantly, and for all cytokines, observed changes were of similar magnitude whether LPS was conjugated or not (Figure 3b).

In agreement with *in vitro* studies on human THP-1 macrophages, we demonstrated that, similarly to native LPS, DOTA-Bodipy-LPS induced the production of pro-inflammatory cytokines. As shown in Figure 4a and as compared to control mice that maintained a constant body temperature, mice injected with either native LPS or DOTA-Bodipy-LPS displayed similar, time-dependent decreases in body temperature that started 2 h after initial LPS injection. Significant amounts of LPS were measured in serum of mice as early as 30 min following LPS injection. This endotoxemia was maintained over the 6 h period, with curves of similar shape whether LPS was conjugated with our probe or not (Figure 4b). No significant amounts of IL-12 were detected when mice were injected with either LPS preparation (data not shown).

Radiolabeling of DOTA-Bodipy-LPS. As has been previously described, ⁵¹Cr or ^{99m}Tc were both used for LPS radiolabeling.^{2–6} However, even if ⁵¹Cr gave interesting results, this radionuclide does not fit with actual radioprotection

recommendations, mostly because of its long half-life (27.7 days) and its 320 keV γ photon. ^{99m}Tc is widely used in radiochemistry, but its chemistry remains rather complicated and gave mixed results in previous studies.¹⁸ Finally, ¹¹¹In was chosen because of its suitable physical characteristics. Its physical half-life (2.8 days) is highly compatible with the radiolabeling procedures using macrocyclic chelating agent. Moreover, indium-111 emits two photons (171 and 245 keV) that are both detected for SPECT imaging.

Radiolabeling of DOTA-Bodipy-LPS was carried out in order to reach a specific activity ranging between 500 and 700 MBq mg⁻¹. The reaction was quenched after 1 h with excess EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) and gave a radiolabeling yield of 70% (700 MBq mg⁻¹) (determined by instant thin layer chromatography (ITLC)). After purification by ultracentrifugation, the radiochemical purity of ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS was >98%, and the product was diluted in 0.9% NaCl prior to injection. After ¹¹¹In labeling, the γ -radiation emission was found to be restricted to the fluorescent LPS-containing fractions (Figure 5a). The emission of the Bodipy fluorophore was not modified by the radiolabeling process, indicating that both fluorescent and radioactive emissions of ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS can be concomitantly monitored, with no apparent quenching effect.

SPECT-CT and Fluorescence Imaging of LPS. Once in the bloodstream, the first step of the elimination mechanisms developed by the body to get rid of LPS is to disrupt highly reactive LPS aggregates. Disaggregated LPS were described to be less active than one LPS aggregate of larger size mimicking blebs that are produced by killed bacteria.^{19,20} This process requires both lipoproteins (which are known as effective LPS carriers) and plasma proteins such as lipopolysaccharides binding protein (LBP) or phospholipid transfer protein (PLTP), which promote the transfer of LPS to lipoproteins leading to their neutralization.^{21–25} Following the initial disaggregation and inactivation step, elimination of LPS from the bloodstream involves their transport to the liver, which has been described to play a major role.^{2,6,26} In particular, after intravenous injection of ⁵¹Cr-labeled LPS into mice, 85% of the initial radioactivity dose was found to be recovered in the liver within 1 h.²⁶ This indicates that the liver has the ability to remove LPS from the bloodstream.

As shown in Figure 6a, SPECT-CT imaging revealed that free ¹¹¹In was directed to the kidneys and excreted into urine within a few hours following injection, with no evidence for radioactive signal in any other tissue. In contrast, most of ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS was found in the liver and the spleen of injected animals. Liver and spleen labeling occurred as early as 30 min following injection, with a maximal signal after 3.5 h. In strong support of SPECT-CT data, γ -counting of excised organs and fluids revealed that most radioactivity was recovered in kidneys and urine from control mice, whereas radioactivity was mainly recovered in liver and spleen of mice injected with ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS.

In liver cuts of control animals injected with NaCl 0.9%, only DAPI-stained nuclei were visible. Conversely, in liver cuts of animals injected with ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS, liver cells showed numerous spots corresponding to fluorescent ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS (Figure 7). Among the different cell types of the liver, only Kupffer cells (KC) (macrophages of the liver) and hepatocytes were described to be able to clear LPS from circulating blood.^{27–29} Both cell types are able to extract LPS from the bloodstream, but probably for distinct purposes. KC

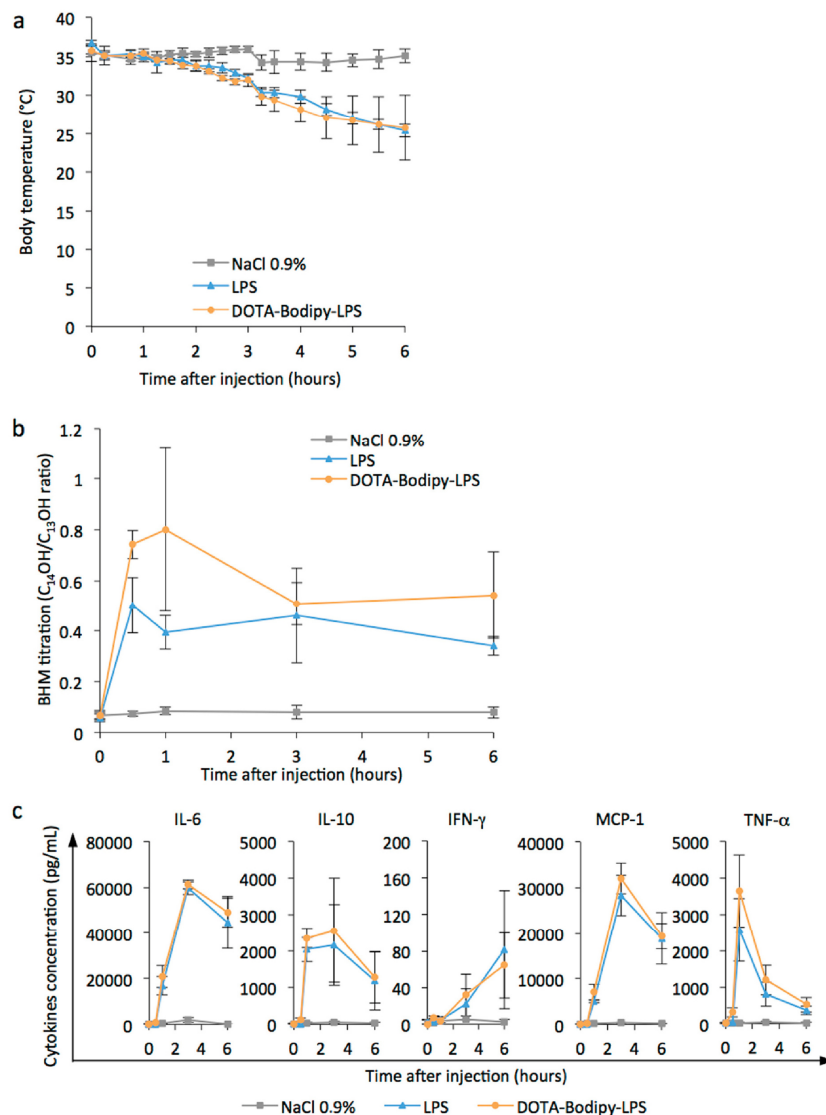


Figure 4. *In vivo* assay for LPS activity after conjugation. (a) Evolution of mice body temperature after LPS injection. The data are the average \pm SD of 4 WT mice/group. (b) BHM titration in sera of injected mice. In BHM titration, the ratio represents the amount of BHM ($C_{14}OH$) recovered after hexane extraction normalized by the internal control ($C_{13}OH$). The data are the average \pm SD of 4 WT mice/group. (c) Titration of cytokines secreted in sera of injected mice. The data are the average \pm SD of 4 WT mice/group.

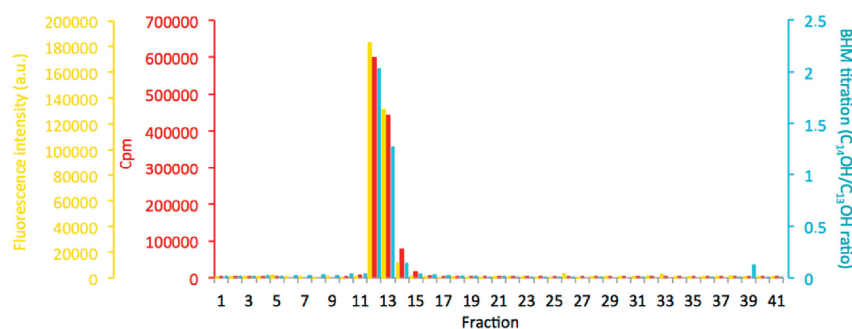


Figure 5. Quality control of ^{111}In -DOTA-Bodipy-LPS. Radiolabeled LPS were eluted through a Superdex75 column; the 0.5-mL fractions were submitted to fluorescence emission, BHM titration, and γ -radiations emission. In BHM titration, the ratio represents the amount of BHM ($C_{14}OH$) recovered after hexane extraction normalized by the internal control ($C_{13}OH$).

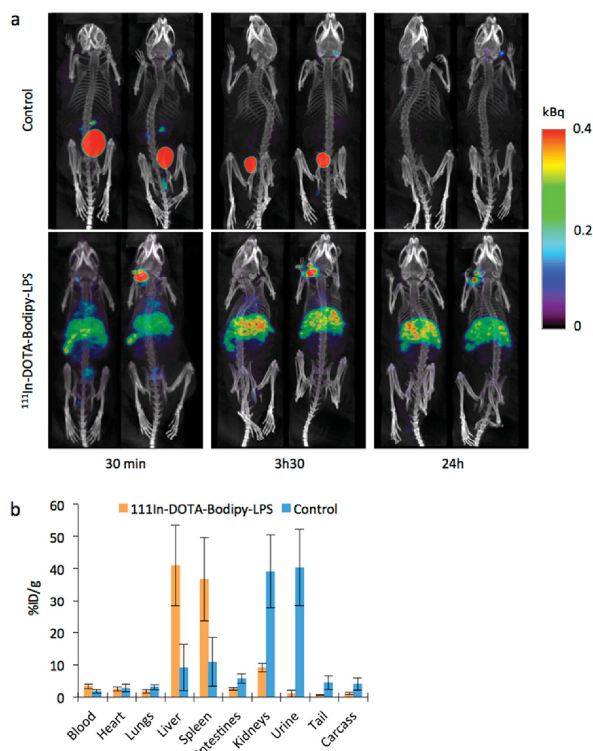


Figure 6. Biodistribution of radiolabeled LPS injected WT mice. (a) SPECT-CT imaging and (b) γ -emission of isolated organs 24 h after injection. The percentage of radioactivity represents the radioactivity of each isolated organ according to the whole radioactivity for each mouse at the time of analysis. Control mice received a co-injection of ¹¹¹In and DOTA-Bodipy-LPS without an incubation step. The data represent 3 WT mice/group, except for the LPS-¹¹¹In injected group for which one mouse died during acquisition of the first time point. Residual ¹¹¹In radiosignal can be detected on some mice at the injection site (jugular vein).

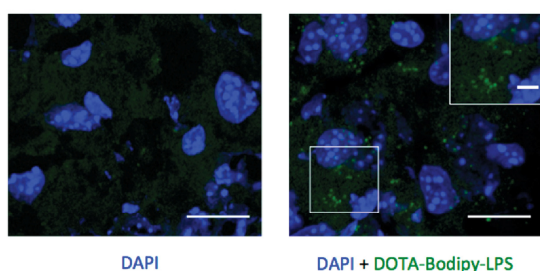


Figure 7. Confocal microscopy images of liver cuts. Fluorescent signal of Bodipy in the livers of NaCl and DOTA-Bodipy-LPS injected WT mice. Scale bar: 20 μ m for the large pictures and 5 μ m for the inner picture.

are able to modify LPS by dephosphorylation³⁰ or deacylation³¹ decreasing their activity, while hepatocytes excrete LPS into the bile prior to being released into the intestine as the final elimination step.^{32,33} Interestingly, exocytosis of endotoxins has been observed after modification of LPS by KCs.³⁴ It is followed by hepatocyte uptake,^{35,36} indicating that the two cell types can function in a cooperative manner to remove LPS from the body. Because biopsies were performed 24 h after LPS

injection in the present study and on the basis of known limitations due to the possibility that detection of the FITC chromophore decreases as FITC-LPS aggregates disperse *in vivo*, the present study did not allow distinguishing between hepatocytes and Kupffer cells for LPS uptake.

Conclusion. The present study has shown that LPS kinetics can be investigated both in whole body and at the cellular level by using a bimodal molecular probe. This fact is assessed by similar biological behavior regarding some specific biological properties of LPS. In particular the Bodipy-labeled LPS exhibit a quick uptake by the liver without renal excretion. Fluorescence examination of liver cuts clearly demonstrates that the hepatic uptake observed by SPECT-CT correlates with the intracellular uptake of fluorescent LPS in liver cells. Resulting observations came in direct and visual support of a centripetal transport of LPS from the periphery toward liver cells.

When combined with LPS molecule, DOTA-Bodipy-NCS is shown here to be particularly relevant. Indeed, ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS was found to retain the main features of native, unlabeled LPS, in particular in terms of aggregation state and pro-inflammatory activity. It made it possible to conduct both SPECT analysis (for visualization of the fate of LPS in the whole body) and fluorescent microscopy (for histological observations in isolated organs) in a concomitant and complementary manner.

METHODS

Reagents. Pure water (18.2 M Ω -cm⁻¹, PURELAB Ultra, ELGA) was used throughout. When metal-free conditions were needed, glassware and plasticware were washed with 3 N HCl and thoroughly rinsed with deionized distilled water. Ammonium acetate buffer was prepared under metal-free conditions using *Trace select* ammonium acetate and acetic acid (Sigma-Aldrich). [¹¹¹In]Indium chloride (¹¹¹InCl₃, 370 MBq mL⁻¹ in 0.05 N HCl) was purchased from Perkin-Elmer.

Animals. All experiments were conducted in wild-type (WT) C57BL/6 mice kept in a virus- and parasite-free barrier facility, in agreement with the guidelines of the ethics committee. For LPS injection experiments, each WT mouse received an intravenous injection of labeled or unlabeled LPS diluted in NaCl 0.9% (0.5 mg kg⁻¹).

Conjugation of DOTA-Bodipy-NCS to LPS. DOTA-Bodipy-NCS was prepared as previously described.⁹ LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) were resuspended at a concentration of 20 mg mL⁻¹ in sodium bicarbonate buffer pH 8.77. One equivalent of DOTA-Bodipy-NCS solubilized in DMSO was added prior to incubation for 1 h at 37 °C with 1000 rpm shaking. Labeled LPS was separated from free bimodal agent by FPLC using a Superdex75 column (GE Healthcare), and fractions containing DOTA-Bodipy-LPS were concentrated with Nanosep MWCO 3 kDa (Pall).

Control of Conjugation Chemistry and Assessment of Biological Properties of DOTA-Bodipy-LPS. Eluted fractions were analyzed for fluorescence emission in a Victor3 Wallac (ThermoFisher) (excitation 488 nm, emission 535 nm) and titrated for β -hydroxymyristate (BHM) according to the general procedure previously described.²⁴

Agarose Gel Electrophoresis. Labeled LPS were also run through 0.5% agarose gel and first analyzed with UV light for Bodipy fluorescence. Then, they were stained with Toluidine blue 0.2% in ethanol/distilled water/acetic acid (50:49:1) and destained with successive ethanol/distilled water/acetic acid (50:49:1) washes. Finally, gels were cut into pieces for BHM titration.

In Vitro Cytokine Production. The THP-1 cell line was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin. For cytokine secretion assay, cells were seeded in 6-wells plates (10⁶ cells per well) and

differentiated into macrophages using 50 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 2 days. Differentiation was checked by FACS analysis using CD11b expression with anti-CD11b-PE antibody (Immunotech). PMA-containing medium was then removed, and differentiated cells were stimulated with labeled or unlabeled LPS (100 ng mL⁻¹) diluted in fresh serum free RPMI. After 5 h, supernatants were harvested, and secreted cytokines (including IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF- α) were detected using CBA Human Inflammation kit (BD biosciences).

In Vivo Pro-inflammatory Activity. After LPS injection, animal temperature was followed using a multistation temperature control unit (Minerve). Blood samples were retro-orbitary collected at various times and centrifuged 10 min at 10000 rpm at 4 °C, and recovered sera were analyzed for cytokines secretion (CBA Mouse Inflammation kit-BD biosciences) and titrated for BHM.

DOTA-Bodipy-LPS Radiolabeling and Biodistribution Study. DOTA-Bodipy-LPS was incubated with ¹¹¹InCl₃ (1 Gbq mg⁻¹ of LPS) in ammonium acetate buffer 0.25 M pH 6.5, during 1 h with 1000 rpm shaking. Unincorporated ¹¹¹In was scavenged by addition of a solution of EDTA 0.05 M in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.6 (1/10th of the reaction volume) and incubated during 15 min. ¹¹¹In-EDTA was removed using Nanosep MWCO 3 kDa and radiolabeled LPS were diluted in 0.9% NaCl prior to injection.

The radiolabeling yield and the presence of free ¹¹¹InCl₃ in the labeled LPS solution were determined using instant thin layer chromatography-silica gel (ITLC-SG) strips from Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA). ITLCs were performed before and after ultrafiltration to determine the radiolabeling yield and to assess the absence of free indium-111. One microliter of each solution was deposited on ITLC-SG strips 2 cm from the bottom. The solvent (sodium citrate 0.1 M pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. Radiolabeled LPS remained at the application point while free indium-111 or ¹¹¹In-chelates migrated with solvent front. The strips were then analyzed using an AR-2000 γ -radiochromatograph (Bioscan).

As a negative control ¹¹¹InCl₃ was mixed extemporaneously with DOTA-Bodipy-LPS (1 Gbq mg⁻¹ of LPS) before injection, without incubation.

LPS distribution in the body was followed by SPECT-CT imaging. After the last acquisition time, mice were sacrificed, and the organs were collected for γ -counting with a scintillation γ -counter (Cobra 4180, Perkin-Elmer) and for immunohistochemical analysis.

SPECT-CT Procedure. Wild-type, C57Bl6 mice were injected through the jugular vein with either ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS or with the uncomplexed ¹¹¹In plus DOTA-Bodipy-LPS mixture (control group) (15 μ g, 9–11 MBq).

SPECT-CT dual imaging was performed 0.5, 3.5, and 24 h after the injection of the radiolabeled DOTA-Bodipy-LPS using a Nano-SPECT/CT small animal imaging tomographic γ -camera (Bioscan). Mice were anaesthetized with isoflurane (1.5–3% in air) and positioned in a dedicated cradle. CT and SPECT acquisitions were performed in immediate sequence. CT acquisitions (55 kVp, 34 mAs) were first acquired during 15–20 min, followed by helical SPECT acquisitions with 60–70 s per projection frame resulting in acquisition times of 30–35 min. Both indium-111 photopeaks (171 and 245 keV) were used with 10% wide energy windows.

The CT and SPECT reconstructions were performed and the SPECT/CT fusion image was obtained using InVivoScope and OsiriX softwares.

Tissue Analysis. Livers and spleens from mice were frozen in OCT-Compound (TissueTEK, Delta Microscopies). Frozen sections (6 μ m) were cut, fixed in acetone at -20 °C for 10 min, and mounted in Vectashield fluorescent mounting medium with DAPI (Vector). Slides were observed with a LSM710 NLO confocal microscope (Zeiss) with excitation at 514 nm and emission from 537 to 600 nm for Bodipy. Liver and spleen cuts of mice injected with ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS were compared to those of mice injected with 0.9% NaCl (control group).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: franck.denat@u-bourgogne.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CheMatech for providing macrocyclic derivatives. Support was provided by the CNRS, the INSERM, the “Université de Bourgogne” and the “Conseil Régional de Bourgogne” through the 3MIM-integrated project (“Marquage de Molécules par les Métaux pour l’Imagerie Médicale”). This work was supported by French Government grants managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” (with references ANR-11-LABX-0021/LipSTIC Labex and ANR-10-EQPX-05-01/IM-APPI Equipex).

REFERENCES

- (1) Munford, R. S. (2008) Sensing Gram-negative bacterial lipopolysaccharides: A human disease determinant? *Infect. Immun.* 76, 454–465.
- (2) Braude, A. I., Carey, F. J., and Zalesky, M. (1955) Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with radioactive sodium chromate. *J. Clin. Invest.* 34, 858–866.
- (3) Ulevitch, R. J. (1978) The preparation and characterization of a radioiodinated bacterial lipopolysaccharide. *Immunochemistry* 15, 157–164.
- (4) Haeflner-Cavaillon, N., Chaby, R., Cavaillon, J. M., and Szabo, L. (1982) Lipopolysaccharide receptor on rabbit peritoneal macrophages. I. Binding characteristics. *J. Immunol.* 128, 1950–1954.
- (5) Rosenbaum, J. T., Hendricks, P. A., Shively, J. E., and McDougall, I. R. (1983) Distribution of radiolabeled endotoxin with particular reference to the eye: concise communication. *J. Nucl. Med.* 24, 29–33.
- (6) Shao, B., Munford, R. S., Kitchens, R., and Varley, A. W. (2012) Hepatic uptake and deacylation of the LPS in bloodborne LPS-lipoprotein complexes. *Innate Immun.* 18, 825–833.
- (7) Triantafyllou, K., Triantafyllou, M., and Fernandez, N. (2000) Lipopolysaccharide (LPS) labeled with Alexa 488 hydrazide as a novel probe for LPS binding studies. *Cytometry* 41, 316–320.
- (8) Cowan, D. B., Noria, S., Stamm, C., Garcia, L. M., Poutias, D. N., del Nido, P. J., and McGowan, F. X., Jr. (2001) Lipopolysaccharide internalization activates endotoxin-dependent signal transduction in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 88, 491–498.
- (9) Bernhard, C., Goze, C., Rousselin, Y., and Denat, F. (2010) First bodipy-DOTA derivatives as probes for bimodal imaging. *Chem. Commun.* 46, 8267–8269.
- (10) Baum, R. P., Prasad, V., Muller, D., Schuchardt, C., Orlova, A., Wennborg, A., Tolmachev, V., and Feldwisch, J. (2010) Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ¹¹¹In- or ⁶⁸Ga-labeled affibody molecules. *J. Nucl. Med.* 51, 892–897.
- (11) Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., and Anderson, C. J. (2010) Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Rev.* 110, 2858–2902.
- (12) Lattuada, L., Barge, A., Cravotto, G., Giovenzana, G. B., and Tei, L. (2011) The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem. Soc. Rev.* 40, 3019–3049.
- (13) Moreau, M., Raguin, O., Vrigneaud, J.-M., Collin, B., Bernhard, C., Tizon, X., Boschetti, F., Duchamp, O., Brunotte, F., and Denat, F. (2012) DOTAGA-Trastuzumab. A new antibody conjugate targeting HER2/Neu antigen for diagnostic purposes. *Bioconjugate Chem.* 23, 1181–1188.

- (14) Culver, J., Akers, W., and Achilefu, S. (2008) Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities. *J. Nucl. Med.* 49, 169–172.
- (15) Kuil, J., Velders, A. H., and Van Leeuwen, F. W. B. (2010) Multimodal tumor-targeting peptides functionalized with both a radio- and a fluorescent label. *Bioconjugate Chem.* 21, 1709–1719.
- (16) Thorp-Greenwood, F. L., and Coogan, M. P. (2011) Multimodal radio- (PET/SPECT) and fluorescence imaging agents based on metallo-radioisotopes: current applications and prospects for development of new agents. *Dalton Trans.* 40, 6129–6143.
- (17) Trubetsky, V. S., Koshkina, N. V., Omel'yanenko, V. G., L'Vov, V. L., Dmitriev, B. A., Petrov, A. B., and Torchilin, V. P. (1990) FITC-labeled lipopolysaccharide: use as a probe for liposomal membrane incorporation studies. *FEBS Lett.* 269, 79–82.
- (18) Hamilton, R. G., and Walker, R. I. (1978) Labeling of endotoxin lipopolysaccharide with technetium-99m pertechnetate. *Experientia* 34, 582–583.
- (19) Oroszlan, S. I., and Mora, P. T. (1963) Dissociation and reconstitution of an endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 345–349.
- (20) Mueller, M., Lindner, B., Kusumoto, S., Fukase, K., Schromm, A. B., and Seydel, U. (2004) Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279, 26307–26313.
- (21) Hailman, E., Alberts, J. J., Wolfbauer, G., Tu, A.-Y., and Wright, S. D. (1996) Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* 271, 12172–12178.
- (22) Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. C., and Kuiper, J. (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 379–414.
- (23) Levels, J. H., Marquart, J. A., Abraham, P. R., Van den Ende, A. E., Molhuizen, H. O., Van Deventer, S. J., and Meijers, J. C. (2005) Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect. Immun.* 73, 2321–2326.
- (24) Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.-L., Paul, C., Le Guern, N., Athias, A., Montange, T., Monier, S., Piard, F., Jiang, X.-C., Masson, D., and Lagrost, L. (2008) Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J. Biol. Chem.* 283, 18702–18710.
- (25) Gautier, T., and Lagrost, L. (2011) Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 984–988.
- (26) Zlydaszyk, J. C., and Moon, R. J. (1976) Fate of ⁵¹Cr-labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice. *Infect. Immun.* 14, 100–105.
- (27) Van Bossuyt, H., De Zanger, R. B., and Wisse, E. (1988) Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts. *J. Hepatol.* 7, 325–337.
- (28) Parent, J. B. (1989) Core-specific receptors for lipopolysaccharide on hepatocytes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 286, 131–144.
- (29) Mimura, Y., Sakisaka, S., Harada, M., Sata, M., and Tanikawa, K. (1995) Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* 109, 1969–1976.
- (30) Hampton, R. Y., and Raetz, C. R. H. (1991) Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation. *J. Biol. Chem.* 266, 19499–19509.
- (31) Munford, R. S., and Hall, C. L. (1985) Uptake and deacylation of bacterial lipopolysaccharides by macrophages from normal and endotoxin-hyporesponsive mice. *Infect. Immun.* 48, 464–473.
- (32) Ribí, E., Anacker, R. L., Brown, R., Haskins, W. T., Malmgren, B., Milner, K. C., and Rudbach, J. A. (1966) Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J. Bacteriol.* 92, 1493–1509.
- (33) Bertok, L. (1998) Effect of bile acids on endotoxin in vitro and in vivo (physico-chemical defense). Bile deficiency and endotoxin translocation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 851, 408–410.
- (34) Fox, E. S., Thomas, P., and Broitman, S. A. (1989) Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of ³H, ¹⁴C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 96, 456–461.
- (35) Freudenberg, M. A., Kleine, B., and Galanos, C. (1984) The fate of lipopolysaccharide in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. *Rev. Infect. Dis.* 6, 483–487.
- (36) Freudenberg, M. A., and Galanos, C. (1990) Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int. Rev. Immunol.* 6, 207–221.

RESULTATS

DISCUSSION

&

CONCLUSIONS

GENERAUX

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

I. Principaux résultats

Depuis plus d'un siècle, le LPS est au centre d'études scientifiques portant sur son activité pro-inflammatoire et de tentatives thérapeutiques tentant d'exploiter ses effets bénéfiques.

Selon certains auteurs, les LPS, notamment ceux des bactéries Gram-négatif de la flore commensale seraient même nécessaires à la mise en place et au maintien du système immunitaire [Rietschel, 1992]. En faveur des LPS, nous pouvons aussi citer leur activité anti-tumorale, déjà décrite il y a plus de 130 ans par William Coley [Coley, 1883] et qui continue d'être étudiée de nos jours [Lundin, 2009]. L'effet adjuvant des LPS est également l'une de leurs vertus. Utilisés comme tel depuis 1955, ils permettent d'optimiser l'efficacité des vaccins en intensifiant la réponse immunitaire dirigée contre un antigène donné [Condie, 1955].

Toutefois, la majorité des effets des LPS restent des effets nocifs. Impliqués dans les maladies auto-immunes [Ang, 2001], l'obésité [Agwunobi, 2000], le diabète [Cani 2007], les rejets de greffes [Ferrara, 2000], c'est surtout son puissant pouvoir pro-inflammatoire, qui lui vaut sa mauvaise réputation. Ainsi, l'administration des LPS est utilisée en routine depuis plus d'un siècle, pour induire l'endotoxémie comme un modèle d'étude de l'inflammation, particulièrement pour étudier le SIRS, composante inflammatoire de certaines pathologies. Ceci s'explique par le fait que les effets physiopathologiques observés dans le cadre de l'endotoxémie et dans celui du SIRS sont identiques : fièvre, diarrhée, hypotension, coagulation intravasculaire. Malgré cette ancienneté de la thématique des LPS et de leur utilisation dans l'Histoire des sciences naturelles, une étude approfondie de la littérature scientifique, révèle une connaissance incomplète et une maîtrise seulement partielle de cette molécule, de ses effets et de leurs mécanismes.

Mes travaux de recherches s'inscrivent dans une tentative d'enrichir notre compréhension de la thématique des effets physiopathologiques des LPS et de consolider les outils techniques et les stratégies d'approche des problématiques relatives à cette thématique.

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

Dans ce cadre, mes travaux de recherches ont permis de dégager trois enseignements principaux :

1. Article n°1

Dans le cadre des études de la réponse inflammatoire induite par les LPS, il est impératif de pouvoir doser correctement les LPS. Or, pour quantifier les LPS en solution avant leur administration et titrer les liquides et/ou les tissus biologiques prélevés post-administration, la technique de dosage par LC-MS/MS développée par notre équipe est actuellement la plus efficace et la plus efficiente. Elle regroupe un ensemble de qualités, que nous ne retrouvons pas ainsi réunis dans les autres techniques disponibles pour doser les LPS : fiabilité, facilité de mise en œuvre, précision, spécificité, sensibilité, sécurité, rapidité et moindre coût.

En outre, bien que le test LAL détermine l'activité biologique des LPS et non pas leur quantité, son utilisation dans une approche combinée avec le dosage des LPS par LC-MS/MS permet de calculer un ratio d'inactivation des LPS chez un sujet donné. Ce ratio est un indicateur inédit, dont l'utilisation en clinique pourrait intervenir dans le management thérapeutique des cas de sepsis infectieux par l'évaluation du risque de choc endotoxinique lors d'un sepsis.

Finalement, l'unique limite de la technique de dosage du LPS par LC-MS/MS concerne la quantification absolue du LPS. En effet, ce mode d'utilisation exige de connaître la stœchiométrie de l'acyle constitutif du lipide A, qui fait office de marqueur, présentement il s'agit de l'acide 3-hydroxymyristique, un acide gras largement répandu dans le lipide A des LPS.

2. Article n°2

Nous avons déterminé l'impact de la longueur de la chaîne O sur les effets physiopathologiques des LPS.

Ainsi, nous avons montré que les effets physiopathologiques des LPS sont la résultante de plusieurs éléments :

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

- l'activité biologique du LPS monomérique dépend de l'ensemble de sa structure chimique (chaîne polysaccharidique + lipide A) et non seulement de la structure du lipide A unanimement considéré comme le principe actif du LPS ;
- l'architecture des complexes supramoléculaires formés par les LPS au-delà de la CAC, est conditionnée par la longueur de la chaîne O ;
- la cinétique d'élimination plasmatique des LPS et leur biodistribution à une concentration supérieure à leur CAC, dépend de l'architecture des complexes supramoléculaires qu'ils forment, ainsi que de leur charge nette de surface.

3. Article °3

Nous avons développé une technique de marquage du LPS et un protocole de suivi *in vivo* en temps réel par TEMP, afin de disposer d'un outil nous permettant de caractériser le métabolisme de tout LPS.

Le marquage bimodal permet de suivre la cinétique des LPS dans l'organisme hôte et leurs biodistributions tissulaire et cellulaire suite à une unique injection. Cette technique associe la sensibilité de l'imagerie radioactive et l'ergonomie de l'imagerie par fluorescence.

En outre, cette méthode multiplexe s'affranchit de la variabilité interindividuelle rencontrée dans la méthode séquentielle. La méthode séquentielle consistant en l'utilisation successive d'un premier échantillon d'individus injectés avec des molécules radiomarquées, puis d'un second échantillon d'individus injectés cette fois avec des molécules fluomarquées. Avec le marquage bimodal, la simultanéité de l'injection des deux types de marquage permet d'analyser comparativement en toute rigueur les informations obtenues par le biais de la mesure de la fluorescence et celles obtenues par la mesure de la radioactivité.

Concrètement, cet outil nous a permis de caractériser le métabolisme global d'un LPS, et notamment son cheminement cellulaire au niveau hépatique. En effet, le suivi de LPS doublement marqués, au niveau systémique et en temps réel par le marquage radioactif, ainsi qu'au niveau cellulaire par la fluorescence, nous a permis de constater le

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

transport des LPS de la périphérie vers le foie et par là même de confirmer le concept de transport inverse du LPS.

II. Discussion générale des résultats

L'un des points d'ombre dans la thématique du LPS concerne la grande variabilité des effets physiopathologiques entre des LPS de chémotypes différents, mais aussi entre les LPS d'un même chémotype. Cette variabilité des effets physiopathologiques est la résultante d'une variabilité de ses deux composantes essentielles :

- l'activité biologique des LPS ;
- le métabolisme des LPS.

Cette variabilité s'explique en partie au moins par des modifications secondaires de la structure chimique du LPS. Tout d'abord, le lipide A étant le principe actif des LPS, les modifications structurelles ou conformationnelles du lipide A sont capables d'affecter la reconnaissance du lipide A par ses différents récepteurs, et donc d'avoir un effet sur l'activité biologique des LPS.

Outre cet aspect de la signalisation lipide A-récepteur, un paramètre physico-chimique essentiel dans la compréhension des effets physiopathologiques des LPS, est leur comportement d'agrégation dans le compartiment vasculaire. En effet, ce comportement d'agrégation a des effets sur le métabolisme des LPS, notamment par ses impacts sur la cinétique d'élimination des LPS et leur biodistribution.

La longueur de la chaîne O étant l'un des éléments clefs dans la classification bactériennes et cette longueur de chaîne O étant susceptible d'avoir des effets à la fois sur :

- la reconnaissance du lipide A par ses récepteurs, en modulant l'exposition du lipide A par encombrement stérique et aussi en affectant la conformation de ses chaînes acyles ;
- le comportement d'agrégation des LPS dans le compartiment vasculaire, en modulant le profil amphipatique des LPS.

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

Nous nous sommes appliqués à tester des LPS tous issus de bactéries Gram-négatif *Salmonella minnesota*, mais avec des chémotypes différents : "*Smooth LPS*" présentement nommé LPS long versus "*Rough LPS*" présentement nommé LPS court. Ces LPS présentent une région lipide A identique, mais diffèrent par la longueur de leur chaîne O comme leurs noms l'indiquent. Ainsi, notre but a été de déterminer l'impact de la longueur de la chaîne O sur les effets physiopathologiques des LPS et ainsi mieux comprendre leur variabilité.

1. Impact de la longueur de la chaîne O sur la reconnaissance du lipide A par ses récepteurs

a. Le concept des PAMPS et des HYPPOS : signaux d'alerte

Janeway explique la réponse immunitaire comme une réaction de l'organisme à la présence de molécules du non-soi [Janeway, 1989], qui sont pour une grande majorité des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ces derniers sont reconnus par des récepteurs PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) présents à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA).

Matzinger propose un autre modèle de la réponse immunitaire. Dans celui-ci, il considère que c'est l'ensemble des molécules possédant une portion hydrophobe, qui sont capables de déclencher une réponse immunitaire [Matzinger, 1994]. Les portions hydrophobes sont nommées "hyppo" par Seong S.Y. et coll., en référence à l'expression *HYdroPhobic POrtions* [Seong, 2004]. Ce modèle de Matzinger inclut autant les molécules appartenant au non-soi (essentiellement les PAMP), que les molécules endogènes à l'organisme.

En effet, il existe de nombreuses molécules endogènes présentant une activité immunostimulatrice et détectées par les PRR : *Heat Shock Proteins* (HSP) [Asea, 2002], InterFéron- α (IFN- α) [Gallucci, 1999], cardiolipine [Peitsch, 1988]... etc. Ces molécules ont toutes une structure chimique présentant une hyppo. Ces facteurs endogènes étant présents de façon constitutive, leur activité immunostimulatrice doit être régulée pour

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

assurer l'équilibre de l'organisme. D'après Seong S.Y. et coll. [Seong, 2004], l'agrégation spontanée des molécules endogènes présentant une hyppo est le mécanisme clef de cette régulation. En effet, en fonction du type d'architecture adopté par les complexes supramoléculaires de ces molécules, les hyppos sont exposées (micelles inverses) ou pas (micelles). Dans le premier cas, les micelles inversées ont tendance à s'agglomérer entre elles pour former des particules de grande taille dont les effets sont délétères. En étendant cette hypothèse à l'ensemble des molécules possédant une hyppo, nous pouvons supposer que l'agrégation spontanée des molécules du non-soi présentant une hyppo a également un impact sur leur activité biologique.

b. Protéines interagissant avec les hyppos

En plus de la régulation de l'activité biologique de ces molécules par leur agrégation, de nombreuses protéines ont la propriété de neutraliser l'hydrophobicité des hyppos et donc d'éviter la formation de ces agglomérats toxiques :

- dans les conditions physiologiques normales ;
- dans des conditions de stress (traumatisme ou maladie).

Dans les conditions physiologiques normales, parmi ces protéines constitutives capables de neutraliser les hyppos, nous trouvons notamment HSP70 et HSP40, des protéines HSP constitutives capables de prévenir l'agrégation des protéines en cours de synthèse [Agashe, 2000]. Les apolipoprotéines [Marcel, 2003] sont elles aussi des protéines capables d'éviter la formation d'agrégats lipidiques de grandes tailles en s'associant aux hyppos des lipides fixés aux lipoprotéines et aussi de stabiliser et d'adresser les lipoprotéines à leurs différentes destinations. Dans les conditions physiologiques normales, les hyppos des protéines et des lipides constitutifs ne sont donc pas exposés.

Dans un contexte de stress, des hyppos appartenant à des lipides membranaires, à des protéines membranaires, à des protéines en cours de synthèse ou à des protéines dénaturées, peuvent être exposés anormalement. D'après Seong S.Y. et coll., les hyppos étant un indicateur de stress, l'apparition des récepteurs capables de les détecter et de les

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

neutraliser a probablement eu lieu précocement dans le processus d'évolution des espèces [Seong, 2004]. Cette détection et cette neutralisation étant nécessaires à une régulation du stress en vue de retrouver l'homéostasie de l'organisme. Par exemple, au-delà d'une certaine température, l'induction de la synthèse de certaines HSP est nécessaire pour neutraliser les hypos des protéines dénaturées par la chaleur afin d'éviter une agrégation toxique de celles-ci et pour favoriser leur repliement normal [Ben-Zvi, 2001]. Les protéines capables de neutraliser les hypos dans des conditions normales sont donc nombreuses à intervenir également, soit en tant que telles, soit en tant qu'isoformes inductibles, dans le processus de retour à l'homéostasie lors des conditions de stress.

Finalement, il existe donc de nombreuses molécules circulantes dans le sang et à la surface des cellules capables de se lier à des hypos à la fois dans des conditions normales et dans des conditions de stress. Ces molécules sont des récepteurs d'hypos dont le rôle est double, en ce qu'elles participent d'une part au métabolisme normal de l'organisme et d'autre part au retour de l'homéostasie en condition de stress. Ces molécules remplissent de nombreuses fonctions :

- neutraliser les hypos des molécules durant leur synthèse, leur transport et leur réparation (CETP et PLTP, ces protéines de la famille LT/LBP jouent ce rôle en orientant certaines molécules vers les lipoprotéines) [Agashe, 2000 ; Glotzer, 2000] ;
- transporter et diriger certaines molécules présentant des hypos vers des voies cataboliques/anaboliques/dégradation [Marcel, 2003 ; Ma, 2004 ; Sumenkova, 2013] (CETP et PLTP jouent également ce rôle en orientant certaines molécules vers les lipoprotéines) ;
- activer les cellules de l'immunité innée (les protéines du complément, certaines protéines de la famille LT/LBP, comme la LBP et la BPI, jouent ce rôle) [Kishore, 2001 ; Seifert, 1990 ; Kairies, 2001 ; Retzinger, 1998 ; Hailman, 1994 ; Muta, 2001].

En guise d'exemple, prenons le cas de la PLTP : dans notre article n°1 nous constatons que, par rapport aux souris de type sauvage, les souris déficientes en PLTP

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

présentent des ratios "LAL/LC-MS/MS" plus élevés durant les premières heures post-injection de LPS. Ces ratios plus élevés traduisent une moindre capacité à inactiver les LPS [cf. Article n°1, Figure 5]. La PLTP joue en effet un rôle crucial en cas d'endotoxémie ; elle prend en charge le transfert des LPS vers les lipoprotéines. L'insertion des LPS dans les lipoprotéines par leur hyppo, soit leur région lipide A, permet de les inactiver et de les transporter vers le foie, où ils sont détoxifiés et éliminés.

c. Conséquences sur l'activité biologique des LPS

Appliquées au cas des LPS, ces considérations confirment et complètent donc nos observations et nos conclusions. D'abord, la conformation du lipide A va naturellement moduler l'interaction des monomère de LPS avec les récepteurs d'hyppos, mais elle va également affecter l'organisation architecturale des complexes supramoléculaires de LPS. En effet, les LPS possédant des lipides A de forme conique ont tendance à s'agréger en des complexes supramoléculaires de structure hexagonal inverse (lipide A exposé à l'extérieur), hautement toxique [Brandenburg, 1993 ; Seydel, 1989 ; Seydel, 2000]. Au contraire, les LPS présentant des lipides A ayant une forme cylindrique ont tendance à s'agréger en des complexes supramoléculaires de structure lamellaire dans lesquels le lipide A est caché à l'intérieur et incapable d'activer la réponse immunitaire [Brandenburg, 1993].

Par ailleurs, en fonction du type architectural des complexes supramoléculaires formés par les LPS, le lipide A peut se retrouver caché à l'intérieur ou exposé à l'extérieur des complexes supramoléculaires de LPS, et donc dans ce dernier cas être accessible aux récepteurs d'hyppos. Les récepteurs d'hyppos dont il est question dans le cas des LPS sont des récepteurs tels que LBP, CD14 et TLR4.

L'impact de la chaîne O sur la conformation du lipide A et sur le type d'architecture adopté par les complexes supramoléculaires de LPS est donc un facteur essentiel de modulation de l'activité biologique des LPS.

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

2. Impact de la longueur de la chaîne O sur les caractéristiques des agrégats de LPS dans le compartiment vasculaire

a. Taille des agrégats

Parce qu'ils vont moduler l'interaction du lipide A avec les récepteurs d'hypos tels que LBP, CD14 et TLR4, la conformation du lipide A des LPS et par conséquent le type architectural des complexes supramoléculaires de LPS, sont des éléments critiques dans la compréhension de l'activité biologique qu'exercent un chémotype donné de LPS.

Toutefois, le type architectural des complexes supramoléculaires de LPS, n'est pas le seul paramètre physico-chimique à considérer pour comprendre l'ensemble des effets physiopathologiques des LPS. Nous devons aussi tenir compte de la taille des complexes supramoléculaires à l'équilibre. Or, cet équilibre n'est possible pour les complexes supramoléculaires, que si la répulsion qui s'exerce entre eux est suffisante. Dans le cas où elle ne l'est pas, les complexes vont s'agglomérer entre eux pour former à l'équilibre des agglomérats de grandes tailles aux effets néfastes. Ainsi, la taille à l'équilibre et donc la charge électrique de surface ou potentiel zêta sont deux autres paramètres physico-chimiques des complexes supramoléculaires de LPS, qui permettent de mieux comprendre les effets physiopathologiques des LPS, notamment par leur impact sur la cinétique d'élimination et la biodistribution des LPS.

b. Conséquences sur la détoxification par extravasation des agrégats de LPS

Dans l'article n°2, l'élimination hépatobiliaire plus lente des LPS longs s'explique probablement par le faible potentiel zêta de leurs complexes supramoléculaires [Hunter, 1988]. En effet, ce faible potentiel favorise l'agglomération des complexes supramoléculaires en des agglomérats de grandes tailles [Stachurski, 1996 ; Uskokovic, 2010]. Nous pouvons supposer qu'au-delà d'une certaine taille, le passage de ces agglomérats au travers du tamis hépatique [Fraser, 1995] devient difficile. Le tamis hépatique est une étape de l'élimination hépatique [Munford, 2005]. Il est composé des fenestrea des cellules endothéliales sinusoidales du foie et représente une barrière poreuse

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

entre le compartiment vasculaire et le foie [Braet, 2002]. Les fenestrea des cellules endothéliales sinusoïdales du foie sont des pores avec un diamètre de $141 \pm 5,4$ nm [Snoeys J 2007]. Parmi les techniques de détermination de taille de particule à notre disposition, la diffusion dynamique de la lumière est celle présentant la limite supérieure de sensibilité la plus élevée, à savoir une taille de particule de $1 \mu\text{m}$ de diamètre. Or, dans le cas des LPS longs, cette technique nous a permis de mettre en évidence des complexes supramoléculaires de 150 nm de diamètre pour les plus imposants. Nous supposons donc, que l'agglomération des complexes supramoléculaires de LPS longs entre eux, aboutit à la formation d'agglomérats de diamètre supérieur à $1 \mu\text{m}$, indétectable par la technique utilisée. Ces agglomérats ayant donc une taille supérieure à celle des pores hépatiques, ils ne peuvent traverser tels quels, le tamis hépatique.

Cette obstruction du tamis hépatique est susceptible d'expliquer la supériorité des quantités hépatiques de LPS courts et la supériorité du temps de résidence plasmatique des LPS longs. En effet, les complexes supramoléculaires de LPS courts ne s'agglomèrent pas du fait d'un potentiel zêta plus élevé (-30 mV), qui assure leur stabilisation électrostatique [Yadav, 2011]. Cette stabilité et leur taille inférieure au diamètre des pores du tamis hépatique leur garantissent une élimination hépatique plus rapide.

3. Impact de la longueur de la chaîne O sur le transport inverse du LPS

Beaucoup de récepteurs d'hypos qui interviennent dans des conditions de stress en reconnaissant des molécules du non-soi, peuvent également participer à maintenir l'homéostasie en conditions normales par la reconnaissance de molécules endogènes. C'est d'ailleurs le cas pour certains des récepteurs d'hypos intervenant dans l'endotoxémie dont les protéines CD14 [Zanoni, 2013] et TLR4 [Trotta, 2014 ; Sirisinha, 2011 ; Fukata, 2007]. En outre, il semble que l'exposition d'une hyppo est le phénomène qui confère à une molécule son caractère inflammatoire, qu'elle soit une molécule endogène ou du non-soi [Thorbecke, 1967 ; Golub, 1969 ; Reding, 1999 ; Saenko, 1999]. A partir de ces deux observations, comme Matzinger, nous supposons que le système immunitaire inné capable de distinguer entre le soi et le non-soi pourrait avoir évolué à partir du système de reconnaissance des hypos des molécules endogènes.

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

Cette supposition peut naturellement être appliquée au cas particulier des LPS. En effet, le métabolisme des lipides et l'immunité innée apparaissent comme deux systèmes connectés. Le transport inverse du cholestérol et le transport inverse du LPS sont à l'interface de ces deux systèmes, notamment parce qu'ils partagent des agents communs : lipoprotéines, PLTP, CETP, transporteur ABC, SR-BI...etc. Ainsi, nous pouvons supposer dans la continuité de Matzinger que cette interface constitue probablement depuis l'apparition des mammifères l'un des moyens qu'utilise le système immunitaire pour lutter contre les pathogènes. Ce chevauchement entre ces deux systèmes est possible essentiellement grâce à la faible spécificité des interactions hydrophobes, qui interviennent lors de la fixation entre un hyppo et un récepteur d'hypos [Finney, 1999]. Du fait de cette faible spécificité, un récepteur d'hypos donné peut fixer différents types de ligands au niveau de leurs hypos. Pour cette raison, le lipide A des LPS peut être pris en charge par les récepteurs d'hypos impliqués dans le transport inverse du cholestérol de la même façon que le cholestérol lui-même. Ce partage d'une même voie de transport entre le cholestérol et les LPS est d'ailleurs confirmé dans l'article n°3 par la visualisation en temps réel du transport inverse du LPS avec accumulation dans le foie.

Par ailleurs, la cinétique d'élimination entre les LPS courts et les LPS longs, présentée dans l'article n°2, est plus rapide pour les premiers, bien que qualitativement leur biodistribution soit identique (présence dans le foie, absence de trace dans les reins et les poumons). Sous l'angle des hypos et de leurs récepteurs, ce point est remarquable dans la mesure où il nous amène à poser la question suivante : La clairance plasmatique des LPS courts est-elle plus rapide du fait d'une meilleure extravasation de leurs agrégats et/ou d'une meilleure prise en charge par les récepteurs d'hypos du transport inverse du LPS, soit pour l'essentiel par les protéines de la famille LT-LBP et les lipoprotéines ?

III. Conclusions et perspectives

L'utilisation de molécules présentant une ubiquité, une diversité et une variabilité telles que celles des LPS, pour induire un modèle d'étude peut poser des interrogations et susciter certaines craintes. En effet, comment interpréter justement des résultats dans le cadre d'un modèle, qui n'est pas parfaitement compris, standardisé et maîtrisé.

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

Ces dernières années, la mise en évidence de la grande complexité de la thématique des LPS, exige plus que jamais de se questionner sur le modèle de l'endotoxémie induite par administration des LPS et surtout d'approfondir notre compréhension de leurs effets physiopathologiques au travers de la séquence causale mises en évidence dans ce travail de recherche :

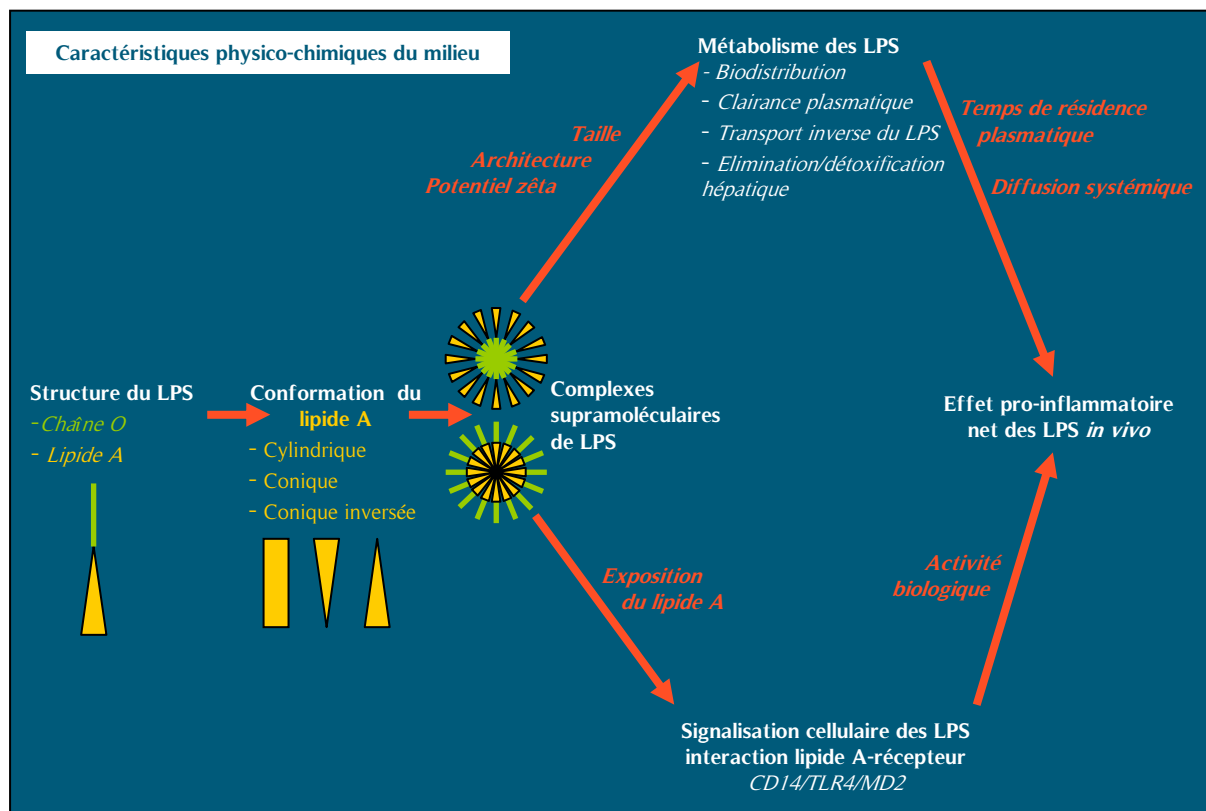


Figure 35. Représentation de la séquence causale mise en jeu dans l'endotoxémie et responsable de l'effet pro-inflammatoire net des LPS.

Sur la base de ces travaux, toute étude mettant en oeuvre des LPS devrait être menée de façon à maîtriser la conformation du lipide A, mais aussi le type architectural des complexes surpamoléculaires de LPS. En effet, ces deux caractéristiques influent conjointement sur l'activité biologique des monomères de LPS et sur le métabolisme des LPS, donc sur leurs effets physiopathologiques.

Pour ce faire, il est possible d'envisager une stratégie basée:

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

- d'une part sur l'utilisation de chémotypes de LPS dont la structure de la région lipide A est identique, et ne différant que par la longueur de leur chaîne O comme cela a été fait présentement ; ceci afin de maîtriser l'organisation des complexes supramoléculaires de LPS ;
- d'autre part sur la modulation de la composition ionique des solutions d'injection [Obst, 1997 ; Garidel, 2005] ; ceci afin de maîtriser la conformation du lipide A.

L'objectif visé à court et moyen termes est d'interpréter avec plus de pertinence les résultats des futures études inhérentes à l'inflammation et au SIRS induits par des LPS, grâce à des paramètres initiaux mieux établis et une séquence de causalité éclaircie.

L'application du marquage bimodal et des protocoles de détection, de dosage et de caractérisation physico-chimiques développés lors des présents travaux, aux différents chémotypes de LPS sus-définis, permettra d'obtenir des données plus larges (élargissement de l'étude de la biodistribution du LPS de l'échelle tissulaire à l'échelle cellulaire), plus nombreuses (données relatives à l'ensemble de l'organisme étudié) et de meilleures qualités (affranchissement de la variabilité interindividuelle) dans le but de déterminer l'impact de la longueur de la chaîne O et de la conformation du lipide A sur les effets physiopathologiques des LPS.

En outre, une utilisation conjointe des techniques de détermination de taille de particules inférieures à 1 μm de diamètre, telle que la DLS, la MET et la MFA présentement utilisées et d'autres comme la cytométrie en flux possédant une limite de sensibilité supérieure plus élevée [Vorauer, 2000 ; Freyssinet, 2009], permettra de détecter et de définir la distribution de taille des complexes moléculaires, autant que de leurs agglomérats.

Dans ce contexte de filiation et d'interconnexion entre le métabolisme des lipides et l'immunité innée, il serait intéressant de mettre en rapport les profils lipoprotéiques et les profils protéiques LT/LBP (concentrations et activités), des souris injectées avec des LPS, afin d'analyser les corrélations éventuelles entre ces profils et les effets physiologiques en

Résultats, Discussion et Conclusions généraux

fonction des paramètres physico-chimiques des LPS : longueur de chaîne O, conformation du lipide A, type architectural et potentiel zêta des complexes supramoléculaires de LPS.

Enfin, la proximité entre le métabolisme des lipides et l'immunité innée, nous permet d'imaginer que les traitements de lutte contre l'athérosclérose visant la régulation des lipoprotéines HDL auront dans un avenir plus ou moins proche de potentielles indications dans la régulation de l'inflammation. Sur le long terme, c'est d'ailleurs le but ultime de ce travail, que de contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies et d'outils innovants de diagnostic, de pronostic et de thérapie pour mieux prendre en charge les patients souffrant de pathologies inflammatoires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Abbey M, Bastiras S, Calvert GD (1985) Immunoprecipitation of lipid transfer protein activity by an antibody against human plasma lipid transfer protein-I. *Biochim Biophys Acta* 833:25-33

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520

Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD (2010) Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 376:1339-1346

Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11:15-25

A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, Deniz J, Ramirez C, Díaz M, Gallardo G, de Galarreta CR, Salazar J, Lopez F, Edwards P, Parks J, Andujar M, Tontonoz P, Castrillo A (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31:245-258

Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolivar JA, Carnero Ruiz C (2003) On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. of Colloid and Interface Sci.* 258:116-122

Agwunobi AO, Reid C, Maycock P, Little RA, Carlson GL (2000) Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3770-3778

Aird WC (2003) The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765-3777

Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, Day JR, Ching AF, Lok S, Tu AY (1995) Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta* 1258:27-34

Références bibliographiques

Alexander C, Rietschel ET (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7:167-202

Alexander S, Bramson J, Foley R, Xing Z (2004) Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 103:93-99

Amoureux MC (2004) Pathophysiological role of endotoxins, a common denominator to various diseases. *Pathol Biol* 52:415-422

Ananthapadmanabhan KP, Goddard ED, Turro NJ, and Kuo PL (1985) Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* 1:352-355

Anderson MS, Bull HG, Galloway SM, Kelly TM, Mohan S, Radika K, Raetz CR (1993) UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of Escherichia coli. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. *J Biol Chem* 268:19858-19865

Anderson MS, Raetz CR (1987) Biosynthesis of lipid A precursors in Escherichia coli. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 262:5159-5169

Ang CW, De Klerk MA, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, van der Meché FG, van Doorn PA (2001) Guillain-Barré syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated Campylobacter jejuni lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits. *Infect Immun* 69:2462-2469

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303-1310

Références bibliographiques

Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B; CUB-Réa Network (2003) Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168:165-172

Annema W, Nijstad N, Tölle M, de Boer JF, Buijs RV, Heeringa P, van der Giet M, Tietge UJ (2010) Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2). *Journal of lipid research* 51:743–754

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028–15034

Astiz ME, Rackow EC (1998) Septic shock. *Lancet* 351:1501-5

Aurell CA, Hawley ME, Wiström AO (1999) Direct visualization of gram-negative bacterial lipopolysaccharide self-assembly. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2:42-46

Aurell CA, Wistrom AO (1998) Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:119-123

Aussel L, Chaby R, Le Blay K, Kelly J, Thibault P, Perry MB, Caroff M (2000) Chemical and serological characterization of the *Bordetella hinzii* lipopolysaccharides. *FEBS Lett* 485:40-46

Références bibliographiques

B

Baclayon M, Roos WH, Wuite GJ. (2010) Sampling protein form and function with the atomic force microscope. *Mol Cell Proteomics*. 9:1678-1688

Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122:461-472

Bahador M, Cross AS (2007) From therapy to experimental model: a hundred years of endotoxin administration to human subjects. *J Endotoxin Res* 13:251-279

Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Glück T, Fröhlich D, Krämer BK, Rothe G, Schmitz G (2009) Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med* 35:1877-1885

Batchelor RA, Haraguchi GE, Hull RA, Hull SI (1991) Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of Escherichia coli. *J Bacteriol* 173:5699-5704

Bateman BT, Schmidt U, Berman MF, Bittner EA (2010) Temporal trends in the epidemiology of severe postoperative sepsis after elective surgery: a large, nationwide sample. *Anesthesiology* 112:917-925

Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G, Russell DW (2009) 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:16764–16769

Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D (1997) Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* 276:1861-1864

Références bibliographiques

Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D (1998) The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 7:906-914

Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D (1999) The three-dimensional structure of human bactericidal/permeability-increasing protein: implications for understanding protein-lipopolysaccharide interactions. *Biochem Pharmacol* 57:225-229

Beebe SP, Tracy M (1907) The treatment of experimental tumors with bacterial toxins. *JAMA* 49, 1493-1498

Ben-Zvi AP, Goloubinoff P (2001) Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* 135:84-93

Berbée JF, Havekes LM, Rensen PC (2005) Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 11:97-103

Berg RD (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473:11-30

Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M (2006) Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from Escherichia coli O55:B5. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 53:9-14

Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. (1997) The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 336:912-918

Bertók L (1977) Physico-chemical defence of vertebrate organisms: the role of bile acids in defence against bacterial endotoxins, *Perspect Biol Med* 21:70-76

Bertók L (1998-a) Effect of bile acids on endotoxin in vitro and in vivo (physico-chemical defence), *Ann NY Acad Sci* 851:408-410

Références bibliographiques

Bertók L (1998-b) Endotoxins and endocrine system, *Domest Anim Endocrinol* 15:305-308

Bertók L (2002) Nonspecific resistance : Role of Bile Acids and Bacterial Endotoxins (Hungarian), *second ed Scientia*

Bertók L (2004) Bile acids in physico-chemical host defence. *Pathophysiology* 11:139-145

Betz SJ, Isliker H (1981) Antibody-independent interactions between Escherichia coli J5 and human complement components. *J Immunol* 127:1748-1754

Billroth T (1865) Beobachtungsstudien über das wundfieber and accidentelle WundKrankheiten. *Arch Klin Chir.* 2,578-667

Birjmohun RS, van Leuven SI, Levels JH, van 't Veer C, Kuivenhoven JA, Meijers JC, Levi M, Kastelein JJ, van der Poll T, Strokes ES (2007) High-density lipoprotein attenuates inflammation and coagulation response on endotoxin challenge in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1153-1158

Björkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, Freeman MW (2004) The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics* 19:319-330

Boivin A, Mesrobian L (1933) Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Substances azotées et phosphorylées "acido-solubles". *C R Soc Biol* 112:76-79

Bommer J, Becker KP, Urbaschek R (1996) Potential transfer of endotoxin across high-flux polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol* 7:883-888

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL (1992) The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-1483

Références bibliographiques

Boon Hinckley M, Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, Cotter RJ, Lauw FN, Golenbock DT, Raetz CR (2005) A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *J Biol Chem* 280:30214-30224

Braet F, Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 1:1

Brandenburg K, Funari SS, Koch MH, Seydel U (1999) Investigation into the acyl chain packing of endotoxins and phospholipids under near physiological conditions by WAXS and FTIR spectroscopy. *J Struct Biol* 128:175-186

Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P (2009) The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. *Curr Med Chem* 16:2653-2660

Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MH, Blume A, Garidel P (2002) Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem* 269:5972-5981

Brandenburg K, Mayer H, Koch MH, Weckesser J, Rietschel ET, Seydel U (1993) Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J Biochem* 218:555-563

Bray D, Robbins PW (1967) The direction of chain growth in *Salmonella anatum* O-antigen biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 28:334-339

Brown M, Hesler C, Tall, AR (1990) Plasma enzymes and transfer proteins in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol* 1:122-127

Références bibliographiques

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B; EPISEPSIS Study Group (2004) EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 30:580-588

Brunellea A, Chauranda P, Della-Negraa S, LeBeyec Y, Baptista GB (1993) Surface secondary electron and secondary ion emission induced by large molecular ion impacts ? *Int J Mass Spectrom* 126:65–73

Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ (2010) The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 8:8-14

Bulawa CE, Raetz CR (1984) The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacylglycosamine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259:4846-4851

Burcelin R, Luche E, Serino M, Amar J (2009) The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front Biosci* 14:5107-5117

C

Cai L, Ji A, de Beer FC, Tannock LR, van der Westhuyzen DR (2008) SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *The Journal of clinical investigation* 118:364–375

Calkin AC, Tontonoz P (2010) Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1513-1518

Camus G, Poortmans J, Nys M, Deby-Dupont G, Duchateau J, Deby C, Lamy M (1997) Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin Sci* 92:415-422

Canı PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772

Canı PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R (2008) Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol* 56:305-309

Carey F J, Braude AL, Zalesky M (1958) Studies with radioactive endo- toxin. III. The effect of tolerance on the distribution of radioactivity after intravenous injection of Escherichia coil endotoxin labelled with 51Cr. *J Clin Invest* 37:441-457

Caroff M, Bundle DR, Perry MB (1984-a) Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:9. *Eur J Biochem.* 139:195-200

Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR (1984-b) Antigenic S-type lipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3. *Infect Immun* 46:384-388

Références bibliographiques

Caroff M, Chaby R, Karibian D, Perry J, Deprun C, Szabó L (1990) Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol* 172:1121-1128

Caroff M, Tacken A, Szabó L (1988) Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the "isolated lipid A" fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydr Res* 175:273-282

Carty SM, Sreekumar KR, Raetz CR (1999) Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem* 274:9677-9685

Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, Tontonoz P (2003) Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 12:805-816

Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ, Warren HS (1990) Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun* 58:2375-2382

Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintão EC, Soriano FG (2008) Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock* 30:590-595

Centanni E (1893) Untersuchungen über das Infektionsfieber - das Fiebergift der Bakterien. *Deut Med Wochschr* 20:148

Chaby R, Sarfati SR, Szabó L (1974) Colorimetric estimation of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid in oligosaccharides with diphenylamine. *Anal Biochem* 58:123-129

Références bibliographiques

Charles MA, Kane JP (2012) New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res* 53:1451-1458

Chart H, Rowe B (1991) Purification of lipopolysaccharide from strains of *Yersinia enterocolitica* belonging to serogroups 03 and 09. *FEMS Microbiol Lett* 61:341-345

Cheung PC, Nebreda AR, Cohen P (2004) TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J* 378:27-34

Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC (2005) Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med* 33:1688-1693

Christiani DC, Wegman DH, Eisen EA, Ye TT, Lu PL, Olenchok SA (1993) Cotton dust and gram-negative bacterial endotoxin correlations in two cotton textile mills. *Am J Ind Med* 23:333-342

Clark RW, Cunningham D, Cong Y, Subashi TA, Tkalcevic GT, Lloyd DB, Boyd JG, Chrnyk BA, Karam GA, Qiu X, Wang IK, Francone OL (2010) Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection. *J Lipid Res* 51:967-974

Clementz T, Raetz CR (1991) A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in *Escherichia coli*. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J Biol Chem* 266:9687-9696

Collet X, Tall AR, Serajuddin H, Guendouzi K, Royer L, Oliveira H, Barbaras R, Jiang XC, Francone OL (1999) Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J Lipid Res* 40:1185-1193

Références bibliographiques

Collins LV, Hackett J (1991) Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173:2521-2529

Condie RM, Zak SJ, Good RA (1955) Effect of meningococcal endotoxin on the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:355-360

Cooper NR et Morisson DC (1978) Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolysaccharides. *J Immunol* 120:1862-1868

Coulthard MG, Swindle J, Munford RS, Gerard RD, Meidell RS (1996) Adenovirus-mediated transfer of a gene encoding acyloxyacyl hydrolase (AOAH) into mice increases tissue and plasma AOAH activity. *Infect Immun*; 64:1510-1515

Cox AD, Hood DW, Martin A, Makepeace KM, Deadman ME, Li J, Brisson JR, Moxon ER, Richards JC (2002) Identification and structural characterization of a sialylated lacto-N-neotetraose structure in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Eur J Biochem* 269:4009-4019

Crane JW, Buller KM (2007) Systemic blockade of complement C5a receptors reduces lipopolysaccharide-induced responses in the paraventricular nucleus and the central amygdala. *Neurosci Lett* 424:10-15

D

Dauphinee SM, Karsan A (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9-22

Day JR, Albers JJ, Lofton-Day CE, Gilbert TL, Ching AF, Grant FJ, O'Hara PJ, Marcovina SM, Adolphson JL (1994) Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J Biol Chem* 269:9388-9391

Degoma EM, Rader DJ (2011) Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat Rev Cardiol* 8:266–277

Dentener MA, Francot GJ, Buurman WA (1996) Bactericidal/permeability-increasing protein, a lipopolysaccharide-specific protein on the surface of human peripheral blood monocytes. *J Infect Dis* 173:252-255

Dentener MA, Francot GJ, Smit FT, Froon AH, Pennings HJ, Wouters EF, Buurman WA (1995) Presence of bactericidal/permeability-increasing protein in disease: detection by ELISA. *J Infect Dis* 171:739-743

Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemant C, Lagrost L (1998) Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 39:131-142

Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palteau V, Gambert P, Lagrost L (1999) Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J* 13:883-892

Desrumaux C, Labeur C, Verhee A, Tavernier J, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Peelman F (2001) A hydrophobic cluster at the surface of the human plasma phospholipid transfer protein is critical for activity on high density lipoproteins. *J Biol Chem* 276:5908-5915

Références bibliographiques

Desrumaux C, Risold PY, Schroeder H, Deckert V, Masson D, Athias A, Laplanche H, Le Guern N, Blache D, Jiang XC, Tall AR, Desor D, Lagrost L (2005) Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J* 19:296-297

Dinarello CA, Cannon JG, Mancilla J, Bishai I, Lees J, Coceani F (1991) Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res* 562:199-206

Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 163:1433-1450

Dinarello CA, Goldin NP and Wolff SM (1974) Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J Exp Med* 139:1369-1381

Discipio RG (1982) The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. *Immunology* 45:587-595

Doerrler WT, Gibbons HS, Raetz CR (2004) MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem* 279:45102-45109

Domingues MM, Castanho MA, Santos NC (2009) rBPI(21) promotes lipopolysaccharide aggregation and exerts its antimicrobial effects by (hemi)fusion of PG-containing membranes. *PLoS One* 4:8385

Dong H, Xiang Q, Gu Y, Wang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, He C, Zhang Y, Wang W, Dong C (2014) Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 511 :52-56

Références bibliographiques

Douwes J, Wouters I, Dubbeld H, van Zwieten L, Steerenberg P, Doekes G, Heederik D (2000) Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation with bio-aerosol exposure. *Am J Ind Med* 37:459-468

Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C, Lawn R (1987) Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature* 327:632-634

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357–1361

E

Emancipator K, Csako G, Elin RJ (1992) In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun* 60:596-601

EP – European Pharmacopoeia (2007). 6.0: 2.6.8. Pyrogens

Everett DH (1988) *Basic Principles of Colloid Science*. London : Royal Society of Chemistry 243 p

F

Feingold KR, Funk JL, Moser AH, Shigenaga JK, Rapp JH, Grunfeld C (1995) Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity. *Infect Immun* 63:2041-2046

Ferrara JL (2000) Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 9:299-306

Finney JL (1999) The Structural Basis of the Hydrophobic Interaction. ed Bellissent-Funel MC, IOS Press

Flegel WA, Baumstark MW, Weinstock C, Berg A, Northoff H (1993) Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect Immun* 61:5140-5146

Flegel WA, Wölpl A, Männel DN, Northoff H (1989) Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Infect Immun* 57:2237-2245

Fomsgaard A, Freudenberg MA, Galanos C (1990) Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 28:2627-2631

Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart JC, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G (2007) Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circulation research* 101:40-49

Forsberg LS, Carlson RW (1998) The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 273:2747-2757

Fox ES, Thomas P, Broitman SA (1988) Uptake and modification of ¹²⁵I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Hepatology* 8:1550-1554

Références bibliographiques

Fraser R, Dobbs BR, Rogers GW (1995) Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21:863-874

Freitag R, Fix M, Brüggemann O (1997) Analysis of endotoxins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18:1899-1905

Freudenberg MA, Bøg-Hansen TC, Back U, Galanos C (1980) Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun* 28:373-380

Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C (1982) Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol* 63:56-65

Freudenberg MA, Galanos C (1985-a) Alterations in rats in vivo of the chemical structure of lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi*. *Eur J Biochem* 152:353-359

Freudenberg N, Freudenberg MA, Bandara K, Galanos C (1985-b) Distribution and localization of endotoxin in the reticuloendothelial system (RES) and in the main vessels of the rat during shock. *Pathol Res Pract* 179: 517-527

Freyssinet JM, Toti F (2010) Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized! *J Thromb Haemost* 8:311-314

Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W (2011) Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem* 286:30926–30936

Fukata M, Abreu MT (2007) TLR4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc Trans* 35:1473-1478

Fukuda I, Tanamoto K, Kanegasaki S, Yajima Y, Goto Y (1989) Deacylation of bacterial lipopolysaccharide in rat hepatocytes in vitro. *Br J Exp Pathol* 70:267-274

G

Galanos C, Lüderitz O, Westphal O (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 9:245-249

Gallay P, Heumann D, Le Roy D, Barras C, Glauser MP (1993) Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9935-9938

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature Med* 5:1249–1255

Gander R, Eller P, Kaser S, Theurl I, Walter D, Sauper T, Ritsch A, Patsch JR, Föger B (2002) Molecular characterization of rabbit phospholipid transfer protein: choroid plexus and ependyma synthesize high levels of phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 43:636-645

Gangloff, M, Gay, NJ (2004) MD-2: the Toll ‘gatekeeper’ in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci* 29:294-300

Garidel P, Rappolt M, Schromm AB, Howe J, Lohner K, Andrä J, Koch MH, Brandenburg K (2005) Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* reflected in a decrease of its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1715:122–131

Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna AL, Paul C, Le Guern N, Athias A, Montange T, Monier S, Piard F, Jiang XC, Masson D, Lagrost L (2008) Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J Biol Chem* 283:18702-18710

Gautier T, Lagrost L (2011-b) Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in ‘reverse lipopolysaccharide transport’ and innate immunity. *Biochemical Society transactions* 39:984–988

Références bibliographiques

Gautier T, Masson D, Lagrost L (2011) Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme. *Endocrinologie-Nutrition* 10-368-A-10

Gautier T, Paul C, Deckert V, Desrumaux C, Klein A, Labbé J, Le Guern N, Athias A, Monier S, Hammann A, Bettaieb A, Jeannin JF, Lagrost L (2010) Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J* 24:3544-3554

Gazzano-Santoro H, Mészáros K, Birr C, Carroll SF, Theofan G, Horwitz AH, Lim E, Aberle S, Kasler H, Parent JB (1994) Competition between rBPI23, a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and gram-negative bacteria. *Infect Immun* 62:1185-1191

Ge Y, Ezzell RM, Tompkins RG, Warren HS (1994) Cellular distribution of endotoxin after injection of chemically purified lipopolysaccharide differs from that after injection of live bacteria. *J Infect Dis* 169:95-104

Genna S, Pang SC, Smith A (1981) Digital scintigraphy: principles, design, and performance. *J Nucl Med* 22:365-371

Gerbod-Giannone MC, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu LC, Tabas I, Tall AR (2006) TNF α induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3112–3117

Ghisletti S, Huang W, Jepsen K, Benner C, Hardiman G, Rosenfeld MG, Glass CK (2009) Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes & development* 23:681–693

Références bibliographiques

Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2007) Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Molecular cell* 25:57–70

Gibbons HS, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR (2005) Role of Mg²⁺ and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol* 55:425-440

Gioannini T, Weiss J (2007) Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 39:249-260

Glomset JA (1998) The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9:155-167

Glotzer JB, Glotzer JB, Saltik M, Chiocca S, Michou AI, Moseley P, Cotten M (2000) Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. *Nature* 407:207–211

Gmeiner J, Lüderitz O, Westphal O. (1969) Biochemical studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants. 6. Investigations on the structure of the lipid A component. *Eur J Biochem* 7:370-379

Godowski PJ (2005) A smooth operator for LPS responses. *Nat Immunol* 6:544-546

Golub ES, Weigle WO (1969) Studies on the induction of immunologic unresponsiveness. 3. Antigen form and mouse strain variation. *J Immunol* 102:389–396

Graaff R, Arsov S, Ramsauer B, Koetsier M, Sundvall N, Engels GE, Sikole A, Lundberg L, Rakhorst G, Stegmayr B (2014) Skin and plasma autofluorescence during hemodialysis: a pilot study. *Artif Organs* 38:515-518

Gray PW, Corcorran AE, Eddy RL Jr, Byers MG, Shows TB (1993) The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing

Références bibliographiques

protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics* 15:188-190

Gray PW, Flaggs G, Leong SR, Gumina RJ, Weiss J, Ooi CE, Elsbach P (1989) Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J Biol Chem* 264:9505-9509

Grossman N, Leive L (1984) Complement activation via the alternative pathway by purified Salmonella lipopolysaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *J Immunol* 132:376-385

Grossman N, Svenson SB, Leive L, Lindberg AA (1990) Salmonella O antigen-specific oligosaccharide-octyl conjugates activate complement via the alternative pathway at different rates depending on the structure of the O antigen. *Mol Immunol* 27:859-865

Gruber A, Mancek M, Wagner H, Kirschning CJ, Jerala R (2004) Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *J Biol Chem* 279: 28475–28482

Guard-Petter J, Lakshmi B, Carlson R, Ingram K (1995) Characterization of lipopolysaccharide heterogeneity in Salmonella enteritidis by an improved gel electrophoresis method. *Appl Environ Microbiol* 61:2845-2851

Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94

Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N (2001) Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98:1429-1439

Références bibliographiques

Gulin S, Pupo E, Schweda EK, Hardy E (2003) Linking mass spectrometry and slab-polyacrylamide gel electrophoresis by passive elution of lipopolysaccharides from reverse-stained gels: analysis of gel-purified lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae* strain Rd. *Anal Chem* 75:4918-4924

Gullberg GT, Reutter BW, Sitek A, Maltz JS, Budinger TF (2010) Dynamic single photon emission computed tomography--basic principles and cardiac applications. *Phys Med Biol* 55:R111-R191

Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI (1997) Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* 276:250-253

Gutsmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. (2001) Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* 69:6942-6950

H

Häcker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Häcker G, Mann M, Karin M (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439:204-207

Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD (1996) Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 271:12172-12178

Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269-277

Hamilton RG, Walker RI (1978) Labeling of endotoxin lipopolysaccharide with technetium-99m pertechnetate. *Experientia* 34:582-583

Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR (1991-a) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352:342-344

Hampton RY, Raetz CR (1991-b) Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation. *J Biol Chem* 266:19499-19509

Han J, Mathison JC, Ulevitch RJ, Tobias PS (1994) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem* 269:8172-8175

Hanuszkiewicz A, Hübner G, Vinogradov E, Lindner B, Brade L, Brade H, Debarry J, Heine H, Holst O (2008) Structural and immunochemical analysis of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter lwoffii* F78 located outside Chlamydiaceae with a Chlamydia-specific lipopolysaccharide epitope. *Chemistry* 14:10251-10258

Références bibliographiques

Hardy E, Kamphuis T, Japaridze A, Wilschut JC, Winterhalter M (2012) Nanoaggregates of micropurified lipopolysaccharide identified using dynamic light scattering, zeta potential measurement, and TLR4 signaling activity. *Anal Biochem*. 430:203-213

Hardy E, Pupo E, Castellanos-Serra L, Reyes J, Fernández-Patrón C (1997) Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc and imidazole salts. *Anal Biochem* 244:28-32

Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH (1990) Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest* 86:696-702

Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, Eichbaum EB, Bland GF, Rapp JH (1993) Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest* 91:1028-1034

Harris HW, Rockey DC, Chau P (1998) Chylomicrons alter the hepatic distribution and cellular response to endotoxin in rats. *Hepatology* 27:1341-1348

Haseley SR, Holst O, Brade H (1998) Structural studies of the O-antigen isolated from the phenol-soluble lipopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* (DNA group 2) strain 9. *Eur J Biochem* 251:189-194

Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM (1988) The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 141:547-552

Heinrichs DE, Yethon JA, Amor PA, Whitfield C (1998) The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific beta-glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *J Biol Chem* 273:29497-29505

Références bibliographiques

Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW (1988) Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 263:5020-5023

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ (2000) Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 165:618-622

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway Jr CA, Ezekowitz RAB (1999) Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science* 284:1313-1318

Holcapek M, Jirásko R, Lída M (2012) Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* 1259:3–15

Hollingsworth RI, Carlson RW, Garcia F, Gage DA (1989) A new core tetrasaccharide component from the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* ANU 843. *J Biol Chem* 264:9294-9299

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752

Howell WH (1885) Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. *Johns Hopkins University Circular* 43:4-5

Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD (2001) Deaths: final data for 1999. *Natl Vital Stat Rep* 49:1-113

Références bibliographiques

Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, Su B (2004) Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 5:98-103

Hubsch AP, Powell FS, Lerch PG, Doran JE (1993) A reconstituted, apolipoprotein A-I containing lipoprotein reduces tumor necrosis factor release and attenuates shock in endotoxemic rabbits. *Circ Shock* 40:14-23

Hunter RJ (1988) Zeta potential in colloid science. Principles and applications. *Academic press* 69-71

Hurlbert RE, Hurlbert I (1977) Biological and physicochemical properties of the lipopolysaccharide of *Chromatium vinosum*. *Infect Immun.* 16:983-994

Huuskonen J, Jauhiainen M, Ehnholm C, Olkkonen VM (1998) Biosynthesis and secretion of human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 39:2021-2030

Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C (2001) The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 155:269-281

Huuskonen J, Wohlfahrt G, Jauhiainen M, Ehnholm C, Telemann O, Olkkonen VM (1999) Structure and phospholipid transfer activity of human PLTP: analysis by molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Lipid Res* 40:1123-1130

I

Israelachvili JN (1991) Intermolecular and surface forces. *Academic Press London* Chapitre 12, pp 213-259

J

Jachymek W, Czaja J, Niedziela T, Lugowski C, Kenne L (1999) Structural studies of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* strain PCM 1207 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 266:53-61

Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Fürll B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schütt C (1997) Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 389:742-745

Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ (1977) Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72: 1268-1270

Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, van der Westhuyzen DR, de Beer FC (2009) HDL remodeling during the acute phase response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:261–267

Janeway C A Jr (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:1–13

Jaszczak RJ, Coleman RE (1985) Single photon emission computed tomography (SPECT). Principles and instrumentation. *Invest Radiol* 20:897-910

Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C (1993) Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem* 268:4032-4036

Jiang XC, Bruce C (1995) Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet. *J Biol Chem* 270:17133-17138

Références bibliographiques

Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall AR (1999) Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 103:907-914

Jiang XC, Qin S, Qiao C, Kawano K, Lin M, Skold A, Xiao X, Tall AR (2001) Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med*. 7:847-852

Jiang Z, Hong Z, Guo W, Xiaoyun G, Gengfa L, Yongning L, Guangxia X (2004) A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 4:527-537

Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine* 9:213–219

K

Kaczyński Z, Braun S, Lindner B, Niehaus K, Holst O (2007) Investigation of the chemical structure and biological activity of oligosaccharides isolated from rough-type *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 13:101-108

Kagan JC, Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955

Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9:361-368

Kairies N, Beisel HG, Fuentes-Prior P, Tsuda R, Muta T, Iwanaga S, Bode W, Huber R, Kawabata S (2001) The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci* 98:13519–13524

Kalyanasundaram K, Thomas JK (1976) Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* 99:2039-2044

Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15:535-548

Katzenellenbogen E, Kocharova NA, Toukach PV, Górska S, Korzeniowska-Kowal A, Bogulska M, Gamian A, Knirel YA (2009) Structure of an abequose-containing O-polysaccharide from *Citrobacter freundii* O22 strain PCM 1555. *Carbohydr Res.* 344:1724-1728

Références bibliographiques

Kaufmann R, Kirsch D, Rood HA, Spengle B (1992) Secondary-ion generation from large keV molecular primary ions incident on a stainless-steel dynode. *Rapid Commun Mass Spectrom* 6:98–104

Kay RE, Walwick ER, Gifford CK (1964) Spectral changes in a cationic dye due to interaction with macromolecules. II. Effects of environment and macromolecule structure. *J Phys Chem* 68:1907-1916

Kayal S, Jaïs JP, Aguin N, Chaudière J, Labrousse J (1998) Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 157:776-784

Keenleyside WJ, Whitfield C (1996) A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J Biol Chem* 271:28581-28592

Keler T, Nowotny A (1986) Metachromatic assay for the quantitative determination of bacterial endotoxins. *Anal Biochem* 156:189-193

Kemper C, Atkinson JP (2007) T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 7:9-18

Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of lipid research* 45:1169–1196

Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR (2003) Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J Lipid Res* 44:1728–1736

Références bibliographiques

Kirschner D, Que Hee SS, Clark CS (1985) Method for detecting the 3-hydroxymyristic acid component of the endotoxins of gram-negative bacteria in compost samples. *Am Ind Hyg Assoc J* 46:741-746

Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, Schumann RR (1997) Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics* 46:416-425

Kishore U, Reid KB (2001) Structures and functions of mammalian collectins. *Results Probl Cell Differ* 33:225-248

Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS (2001) Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* 108:485-493

Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS (1999) Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem* 274:34116-34122

Kittelberger R, Hilbink F (1993) Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 26:81-86

Kleine B, Freudenberg MA, Galanos C (1985) Excretion of radioactivity in faeces and urine of rats injected with 3H,14C-lipopolysaccharide. *Br J Exp Pathol* 66:303-308

Klena JD, Pradel E, Schnaitman CA (1993) The rfaS gene, which is involved in production of a rough form of lipopolysaccharide core in Escherichia coli K-12, is not present in the rfa cluster of Salmonella typhimurium LT2. *J Bacteriol* 175:1524-1527

Knirel YA, Bystrova OV, Shashkov AS, Lindner B, Kocharova NA, Senchenkova SN, Moll H, Zähringer U, Hatano K, Pier GB (2001) Structural analysis of the lipopolysaccharide

Références bibliographiques

core of a rough, cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* 268(17):4708-4719

Knolle PA, Gerken G (2000) Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174: 21-34

Knolle PA, Löser E, Protzer U, Duchmann R, Schmitt E, zum Büschenfelde KH, Rose-John S, Gerken G. (1997) Regulation of endotoxin- induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* 107: 555-561

Komuro T, Galanos C (1988) Analysis of Salmonella lipopolysaccharides by sodium deoxycholate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr* 450:381-387

Kostner GM, Oetl K, Jauhiainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H (1995) Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 305:659-667

Krieger M (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108:793-797

Références bibliographiques

L

Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P (1993) Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* 23:2144-2151

Labischinski H, Naumann D, Schultz C, Kusumoto S, Shiba T, Rietschel ET, Giebrecht P (1989) Comparative X-ray and Fourier-transform-infrared investigations of conformational properties of bacterial and synthetic lipid A of *Escherichia coli* and *Salmonella minnesota* as well as partial structures and analogues thereof. *Eur J Biochem* 179:659-665

Lagrost L (1994) Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1215:209-236

Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P (1998) Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 9:203-209

Lamping N, Dettmer R, Schröder NW, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, Schumann RR (1998) LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest* 101:2065-2071.

Lamping N, Hoess A, Yu B, Park TC, Kirschning CJ, Pfeil D, Reuter D, Wright SD, Herrmann F, Schumann RR (1996) Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol* 157:4648-4656

Lavoie J, Marchand G (1997) Détermination des caractéristiques à considérer d'un point de vue de santé et sécurité des travailleurs dans les centres de compostage des déchets domestiques. *Etudes et Recherches : rapport IRSST* (Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec) p. 1-37

Références bibliographiques

Le Blay K, Gueirard P, Guiso N, Chaby R (1997) Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* 143:1433-1441

Le Dur A, Chaby R, Szabó L (1980) Isolation of two protein-free and chemically different lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* phenol-extracted endotoxin. *J Bacteriol* 143:78-88

Le Gall JR, Metnitz P (2002) Quels scores pronostiques dans le sepsis ? *Réanimation* 11:178-185

Lebbar S, Haeffner-Cavaillon N, Karibian D, Le Beyec Y, Caroff M (1995) 252Cf-plasma desorption mass spectrometry analysis of lipids A obtained by an elimination reaction under mild conditions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9:693-696

Lerouge I, Vanderleyden J (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* 26:17-47

Levels JH, Marquart JA, Abraham PR, van den Ende AE, Molhuizen HO, van Deventer SJ, Meijers JC (2005) Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect Immun* 73:2321-2326

Levin J, Bang FB (1964) The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115:265-274

Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL (1993) In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12040-12044

Li J, Purves RW, Richards JC (2004) Coupling capillary electrophoresis and high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry mass spectrometry for the analysis of complex lipopolysaccharides. *Anal Chem* 76:4676-4683

Références bibliographiques

Li Y, Dong JB, Wu MP (2008) Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice. *Eur J Pharmacol* 590:417-422

Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I (2005) Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 280:21763–21772

Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE 3rd (2003) C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J Immunol* 171, 2594-2601

Loos M, Bitter-Suermann D, Dierich M (1974) Interaction of the first (C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement with different preparations of bacterial lipopolysaccharides and with lipid A. *J Immunol* 112:935-940

Lowry SF (2005) Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock* 24:94-100

Lualdi M, Colombo A, Leo E, Morelli D, Vannelli A, Battaglia L, Poiasina E, Marchesini R (2007) Natural fluorescence spectroscopy of human blood plasma in the diagnosis of colorectal cancer: feasibility study and preliminary results. *Tumori* 93:567-571

Luderitz O, Hammer D, Goebel F, Sievers K, Westphal O (1958) Inactivation of the endotoxic activity of bacterial lipopolysaccharides in serum plasma and whole blood of horses]. *Z Naturforsch B* 13B:566-571

Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH (1988) Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8:232-236

Références bibliographiques

Lundin JJ, Checkoway H (2009) Endotoxin and cancer. *Environ Health Perspect* 117:1344-1350

Lund-Katz S, Hammerschlag B, Phillips MC (1982) Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum high- and low-density lipoproteins. *Biochemistry* 21:2964-2969

Lundström SL, Li J, Månsson M, Figueira M, Leroy M, Goldstein R, Hood DW, Moxon ER, Richards JC, Schweda EK (2008) Application of capillary electrophoresis mass spectrometry and liquid chromatography multiple-step tandem electrospray mass spectrometry to profile glycoform expression during *Haemophilus influenzae* pathogenesis in the chinchilla model of experimental otitis media. *Infect Immun* 76:3255-3267

Lusis AJ, Zollman S, Sparkes RS, Klisak I, Mohandas T, Drayna D, Lawn RM (1987) Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics* 1:232-235

Lyklema J (1991) *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Amsterdam : Elsevier Publishing Company

Références bibliographiques

M

Ma J, Liao XL, Lou B, Wu MP (2004) Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin* 36:419-424

Macgee J, Doudoroff M (1954) A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J Biol Chem* 210:617-626

Maitra SK, Nachum R, Pearson FC (1986) Establishment of beta-hydroxy fatty acids as chemical marker molecules for bacterial endotoxin by gas chromatography-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 52:510-514

Malik P, Berisha SZ, Santore J, Agatisa-Boyle C, Brubaker G, Smith JD (2011) Zymosan-mediated inflammation impairs in vivo reverse cholesterol transport. *Journal of lipid research* 52:951-957

Männel D, Mäkelä PH, Mayer H (1978) Enterobacterial common antigen in mutant strains of Salmonella. *J Bacteriol* 135:348-353

Marcel YL, Kiss RS (2003) Structure–function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations. *Curr Opin Lipidol* 14:151-157

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554

Massey JB, Hickson D, She HS, Sparrow JT, Via DP, Gotto AM Jr, Pownall HJ (1984) Measurement and prediction of the rates of spontaneous transfer of phospholipids between plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 794:274-280

Massey JB, Hickson-Bick D, Via DP, Gotto AM Jr, Pownall HJ (1985) Fluorescence assay of the specificity of human plasma and bovine liver phospholipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* 835:124-131

Références bibliographiques

- Masson D, Drouineaud V, Moiroux P, Gautier T, Dautin G, Schneider M, Fruchart-Najib J, Jauhainen M, Ehnholm C, Sagot P, Gamber P, Jimenez C, Lagrost L (2003) Human seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein. *Mol Hum Reprod* 9:457-464
- Masucci-Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, Richardson H, Walsh A, Breslow JL, Tall A (1995) Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J Clin Invest* 95:1587-1594
- Mathison JC, Ulevitch RJ (1979) The clearance, tissue distribution and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* 123:2133-2143
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045
- McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP (2009) Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 119:1135-1145
- McLean LR, Phillips MC (1981) Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 20:2893-2900
- Meier-Dieter U, Barr K, Starman R, Hatch L, Rick PD (1992) Nucleotide sequence of the Escherichia coli rfe gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the rfe-rff gene cluster. *J Biol Chem* 267:746-753
- Merkus HG (2009) Dynamic Light Scattering. In : *Particle Size Measurements*. 17:299-317
- Mey A, Ponard D, Colomb M, Normier G, Binz H, Revillard JP (1994) Acylation of the lipid A region of a Klebsiella pneumoniae LPS controls the alternative pathway activation of human complement. *Mol Immunol* 31:1239-1246

Références bibliographiques

Meyer E (1992) Atomic force microscopy. *Prog Surf Sci.* 41:3-49

Miletic AV, Graham DB, Montgrain V, Fujikawa K, Kloeppel T, Brim K, Weaver B, Schreiber R, Xavier R, Swat W (2007) Vav proteins control MyD88-dependent oxidative burst. *Blood* 109:3360-3368

Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K.(1995) Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* 109:1969-1976

Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22:240-273

Morisson DC, Kline LF (1977) Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol* 118:362-368

Morris NM, Catalano EA (1990) A chemical method for determining endotoxins in cotton dust and lint without extraction. *Textile Research Journal* 60:421-426

Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, Fukase K, Schromm AB, Seydel U (2004) Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem.* 279:26307-26313

Müller M, Scheel O, Lindner B, Gutschmann T, Seydel U. (2003) The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. *J Endotoxin* 9:181-186

Müller-Loennies S, Lindner B, Brade H (2003) Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of Escherichia coli K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis. *J Biol Chem* 278:34090-34101

Munford RS (2005) Detoxifying endotoxin: time, place and person *J Endotoxin Res* 11:69-84

Références bibliographiques

Munford RS, DeVeaux LC, Cronan JE Jr, Rick PD (1992) Biosynthetic radiolabeling of bacterial lipopolysaccharide to high specific activity. *J Immunol Methods* 148:115-120

Munford RS, Hall CL, Dietschy JM (1981) Binding of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides to rat high-density lipoproteins. *Infect Immun* 34:835-843

Musson RA, Morrison DC, Ulevitch RJ (1978) Distribution of endotoxin (lipopolysaccharide) in the tissues of lipopolysaccharide-responsive and unresponsive mice. *Infect Immun* 21:448-457

Muta T, Takeshige K (2001) Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4. Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem* 268:4580-4589

Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 187:2097-2101

Myc A, Buck J, Gonin J, Reynolds B, Hammerling U, Emanuel D (1997) The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:113-116

Références bibliographiques

N

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3:667-672

Nakagawa Y, Maeda H, Murai T (2002) Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:588-597

Nakajima A (1974) Solvent enhancement in the first singlet-singlet transition of pyrene-d10. *Spectrochimica Acta* 30:860-862

Nakajima A (1976) Fluorescence spectra of pyrene in chlorinated aromatic solvents. *J. Lumin.* 11:429-432

Nakano K, Tozuka Y, Yamamoto H, Kawashima Y, Takeuchi H (2008) A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy. *Int J Pharm.* 355:203-209

Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM (2011) HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 8:222–232

Neal PA, Schneiter R, Barbara H, Caminita (1942) Report on acute illness among rural mattress makers using low grade, stained cotton. *JAMA* 119:1074-1082

Ngo ML, Mahdi F, Kolte D, Shariat-Madar Z (2009) Upregulation of prolylcarboxypeptidase (PRCP) in lipopolysaccharide (LPS) treated endothelium promotes inflammation. *J Inflamm (Lond)* 6:3

Niedziela T, Dag S, Lukasiewicz J, Dzieciatkowska M, Jachymek W, Lugowski C, Kenne L (2006) Complete lipopolysaccharide of *Plesiomonas shigelloides* O74:H5 (strain CNCTC

Références bibliographiques

144/92). 1. Structural analysis of the highly hydrophobic lipopolysaccharide, including the O-antigen, its biological repeating unit, the core oligosaccharide, and the linkage between them. *Biochemistry* 45:10422-10433

Nikaido H (1994) Prevention of drug access to bacterial targets : permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-388

Nixdorff K, Gmeiner J, Martin HH (1978) Interaction of lipopolysaccharide with detergents and its possible role in the detergent resistance of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 510:87-98

O

Oberheide J, Wilhelms P and Zimmer M (1997) New results on the absolute ion detection efficiencies of a microchannel plate. *Meas Sci Technol* 8:351-354

Obst S, Kastowsky M, Bradaczek H (1997) Molecular dynamics simulations of six different fully hydrated monomeric conformers of Escherichia coli re-lipopolysaccharide in the presence and absence of Ca²⁺. *Biophys J* 72:1031-1046

Oka T, Kujiraoka T, Ito M, Egashira T, Takahashi S, Nanjee MN, Miller NE, Metso J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Jauhiainen M, Hattori H (2000) Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *J Lipid Res* 41:1651-1657

Okuda S, Sato M, Uchiyama H, Takahashi H (1975) Degradation of lipopolysaccharide of Escherichia coli by hot phenol extraction. *J Gen Appl Microbiol Immunol* 40:323-322

Onoue S, Niwa M, Isshiki Y, Kawahara K (1996) Extraction and characterization of the smooth-type lipopolysaccharide from Fusobacterium nucleatum JCM 8532 and its biological activities. *Microbiol Immunol* 40:323-331

P

Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, ten Cate JW, van Deventer SJ (1996) Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med* 184:1601-1608

Parillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328:1471-1477

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195

Park CY, Jung SH, Bak JP, Lee SS, Rhee DK (2005) Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals* 33:145-151

Patton GM, Robins SJ, Fasulo JM, Clark SB (1985) Influence of lecithin acyl chain composition on the kinetics of exchange between chylomicrons and high density lipoproteins. *J Lipid Res* 26:1285-1293

Pedron T, Girard R, Eustache J, Bulusu AR, Macher I, Radzyner-Vyplel H, Stütz PL, Chaby R. (1992) New synthetic analogs of lipid A as lipopolysaccharide agonists or antagonists of B lymphocyte activation. *Int Immunol* 4:533-540

Peitsch MC, Tschopp J, Kress A, Isliker H (1988) Antibody-independent activation of the complement system by mitochondria is mediated by cardiolipin. *Biochem J* 249:495-500

Pfeiffer R (1892) Untersuchungen über das cholera gift. *Z Hyg InfektKr* 11:393-412

Phillips MC (2014) Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 289:24020-24029

Pine DJ, Weitz DA, Zhu JX, Herbolzheimer E (1990) Diffusing-wave spectroscopy: dynamic light scattering in the multiple scattering limit. *J. Phys.* 51:2101-2127

Références bibliographiques

Polissi A, Sperandeo P (2014) The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Mar Drugs* 12:1023-1042

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088

Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM (2010) Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712–2723

Pownall HJ, Bick DLM, Massey JB (1991) Spontaneous phospholipid transfer: development of a quantitative model. *Biochemistry* 30:5696-5700

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS (1993) Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2744-2748

Punzi L, Scanu A (2013) Rôle du complément dans la pathogénie de l'arthrose. *La Lettre du Rhumatologue* n°395, p.14-17 Edimark, Puteaux, FRANCE

Pupo E, López CM, Alonso M, Hardy E (2000) High-efficiency passive elution of bacterial lipopolysaccharides from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 21:526-530

Pupo E, Phillips NJ, Gibson BW, Apicella MA, Hardy E (2004) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of lipopolysaccharide species separated by slab-polyacrylamide gel electrophoresis: high-resolution separation and

Références bibliographiques

molecular weight determination of lipooligosaccharides from *Vibrio fischeri* strain HMK.

Electrophoresis 25:2156-2164

Pussinen PJ, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C (1997) Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the pig plasma phospholipid transfer protein. *J*

Lipid Res 38:1473-1481

Q

Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X (2001) IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* 276:41661-41667

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Girons IS, Werts C, Raetz CR (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem* 279:25420-25429

Quintão EC, Cazita PM (2010) Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis* 209:1-9

Références bibliographiques

R

Rader DJ, Jaye M (2000) Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol* 11:141-147

Raetz CR (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170

Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76:295-329

Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700

Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ (1997) Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry* 36:3645-3653

Ray BL, Painter G, Raetz CR (1984) The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* Apr 259:4852-4859

Ray BL, Raetz CR (1987) The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *J Biol Chem* 262:1122-1128

Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Kane JP, Rapp JH (1993) The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. *Eur Heart J* 14(Suppl K):125-129

Recalde D, Ostos MA, Badell E, Garcia-Otin AL, Pidoux J, Castro G, Zakin MM, Scott-Algara D (2004) Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:756-761

Références bibliographiques

Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Key NS, Conti-Fine BM (1999) CD4+ T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. *Thromb Haemost* 82:509–515

Retzinger GS, DeAnglis AP, Patuto SJ (1998) Adsorption of fibrinogen to droplets of liquid hydrophobic phases. Functionality of the bound protein and biological implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1948–1957

Ribi E, Anacker RL, Brown R, Haskins WT, Malmgren B, Milner KC, Rudbach J (1966) Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J Bacteriol.* 9:1493-1509

Ridley BL, Jeyaretnam BS, Carlson RW (2000) The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient rhizobium lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method. *Glycobiology* 10:1013-1023

Rietschel ET, Brade H (1992) Bacterial endotoxins. *Sci Am* 267:54-61

Robbins PW, Bray D, Dankert BM, Wright A (1967) Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science* 158:1536-1542

Rocchetta HL, Burrows LL, Pacan JC, Lam JS (1998) Three rhamnosyltransferases responsible for assembly of the A-band D-rhamnan polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a fourth transferase, WbpL, is required for the initiation of both A-band and B-band lipopolysaccharide synthesis. *Mol Microbiol* 28:1103-1119

Rocchetta HL, Lam JS (1997) Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:4713-4724

Références bibliographiques

Roes S, Mumm F, Seydel U, Gutschmann T (2006) Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. *J Biol Chem* 281:2757-2763

Roseman HA, Thompson TE (1980) Mechanism of the spontaneous transfer of phospholipids between bilayers. *Biochemistry* 19:439-444

Rosenbaum JT, Hendricks PA, Shively JE, McDougall IR (1983) Distribution of radiolabeled endotoxin with particular reference to the eye: concise communication. *J Nucl Med* 24:29-33

Rosenfeld Y, Barra D, Simmaco M, Shai Y, Mangoni ML, (2006) A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *J Biol Chem* 281, 28565-28574

Roslansky PF, Dawson ME, Novitsky TJ. (1991) Plastics, endotoxins, and the Limulus amoebocyte lysate test. *J Parenter Sci Technol* 45:83-87

Rosner MR, Tang J, Barzilay I, Khorana HG (1979) Structure of the lipopolysaccharide from an Escherichia coli heptose-less mutant. I. Chemical degradations and identification of products. *J Biol Chem* 254:5906-5917

Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126

Roth RI, Levin FC, Levin J (1990) Optimization of detection of bacterial endotoxin in plasma with the Limulus test. *J Lab Clin Med* 116:153-161

Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 40:781-796

Références bibliographiques

Rudbach JA, Anacker RL, Haskins WT, Johnson AG, Milner KC, Ribí E (1966-b) Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin, *Ann NY Acad Sci* 133:629-635

Rudbach JA, Johnson AG (1966-a) Alteration and restoration of endotoxin activity after complexing with plasma proteins. *J Bacteriol* 92:892-898

Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, Vandelli MA (2011) AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *Int J Nanomedicine*. 6:557-563

Ruozi B, Tosi G, Forni F, Fresta M, Vandelli MA (2005) Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci*. 25:81-89

Références bibliographiques

S

Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG (1999) Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc* 9:185–192

Salyers AA, Whitt DD (1994) Bacterial pathogenesis : a molecular approach. ASM Press : Washington

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) In: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., p.16-23. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Santos NC, Silva AC, Castanho MA, Martins-Silva J, Saldanha C (2003) Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy. *Chembiochem*. 4:96-100

Sasaki H, White SH (2008) Aggregation behavior of an ultra-pure lipopolysaccharide that stimulates TLR-4 receptors. *Biophys J*. 95:986-993

Schnaitman CA, Klena JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* 57:655-682

Schrohm AB, Brandenburg K, Rietschel ET, Flad HD, Carroll SF, Seydel U (1996) Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett* 399:267-271

Schrohm AB, Howe J, Ulmer AJ, Wiesmüller KH, Seyberth T, Jung G, Rössle M, Koch MH, Gutschmann T, Brandenburg K (2007) Physicochemical and biological analysis of synthetic bacterial lipopeptides: validity of the concept of endotoxic conformation. *J Biol Chem* 282:11030-11070

Schrohm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT (2001) Molecular genetic analysis of an endotoxin

Références bibliographiques

nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 194:79-88

Schumann RR, Latz E (2000) Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 74:42-60

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431

Schwartz DA (2001) Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 163:305-306

Seifert PS, Hugo F, Tranum-Jensen J, Zähringer U, Muhly M, Bhakdi S (1990) Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J Exp Med* 172:547-557

Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4:469-478

Sewnath ME, Levels HH, Oude Elferink R, van Noorden CJ, ten Kate FJ, van Deventer SJ, Gouma DJ (2000) Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatology* 32:1289-1299

Seydel U, Brandenburg K, Koch MH, Rietschel ET (1989) Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction. *Eur J Biochem* 186:325-332

Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K. (2000) Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem* 267:3032-3039

Références bibliographiques

Shands JW Jr, Chun PW. (1980) The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *J Biol Chem.* 255:1221-1226

Shands JW Jr, Graham JA, Nath K (1967) The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J Mol Biol.* 25:15-21

Sharma SK (1986) Endotoxin detection and elimination in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 8:5-22

Shear MJ, Turner FC (1943) Chemical treatment of tumors. V. Isolation of hemorrhagic-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J Natl Cancer Inst* 4:81-87

Shnyra A, Hultenby K, Lindberg AA. (1993) Role of the physical state of Salmonella lipopolysaccharide in expression of biological and endotoxic properties. *Infect Immun* 61:5351-5360

Silipo A, De Castro C, Lanzetta R, Molinaro A, Parrilli M, Vago G, Sturiale L, Messina A, Garozzo D (2008) Structural characterizations of lipids A by MS/MS of doubly charged ions on a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 43:478-484

Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B (1989) Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73:284-289

Sirisinha S (2011) Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29:1-14

Skarnes RC, Rosen FS, Shear MJ, Landy M (1958) Inactivation of endotoxin by a humoral component. II. Interaction of endotoxin with serum and plasma. *J Exp Med* 108:685-699

Références bibliographiques

Smoak K, Madenspacher J, Jeyaseelan S, Williams B, Dixon D, Poch KR, Nick JA, Worthen GS, Fessler MB (2008) Effects of liver X receptor agonist treatment on pulmonary inflammation and host defense. *Journal of immunology* 180:3305–3312

Smoak KA, Aloor JJ, Madenspacher J, Merrick BA, Collins JB, Zhu X, Cavigiolio G, Oda MN, Parks JS, Fessler MB (2010) Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell metabolism* 11:493–502

Snoeys J, Lievens J, Wisse E, Jacobs F, Duimel H, Collen D, Frederik P, De Geest B (2007) Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae. *Gene Ther* 14:604–612

Speijer H, Groener JE, van Ramshorst E, van Tol A (1991) Different locations of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities in plasma. *Atherosclerosis* 90:159-168

Sperandeo P, Dehò G, Polissi A (2009) The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1791:594-602

Sprong T, Netea MG, van der Ley P, Verver-Jansen TJ, Jacobs LE, Stalenhoef A, van der Meer JW, van Deuren M (2004) Human lipoproteins have divergent neutralizing effects on E. coli LPS, N. meningitidis LPS, and complete Gram-negative bacteria. *J Lipid Res* 45:742-749

Stachurski J, MichaLek M (1996) The Effect of the zeta Potential on the Stability of a Non-Polar Oil-in-Water Emulsion. *J Colloid Interface Sci* 184:433-436

Stefan Obst, Manfred Kastowsky, Hans Bradaczek (1997) Molecular Dynamics Simulations of Six Different Fully Hydrated Monomeric Conformers of Escherichia coli Re-Lipopolysaccharide in the Presence and Absence of Ca²⁺. *Biophys J* 72:1031-1046

Références bibliographiques

Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP, van der Poll T (1996) Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* 76:738-742

Stöver AG, Da Silva Correia J, Evans JT, Cluff CW, Elliott MW, Jeffery EW, Johnson DA, Lacy MJ, Baldridge JR, Probst P, Ulevitch RJ, Persing DH, Hershberg RM. (2004) Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem* 279:4440-4449

Strauss J, Burnham NA, Camesano TA (2009) Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of E. coli. *Mol Recognit.* 22:347-355

Sturm S, Fortnagel P, Timmis KN (1984) Immunoblotting procedure for the analysis of electrophoretically-fractionated bacterial lipopolysaccharide. *Arch Microbiol* 140:198-201

Sumenkova DV, Polyakov LM, Panin LE (2013) Apolipoprotein A-I as a carrier of lipopolysaccharide into rat hepatocytes. *Bull Exp Biol Med* 155:738-740

Sun Y, Ishibashi M, Seimon T, Lee M, Sharma SM, Fitzgerald KA, Samokhin AO, Wang Y, Sayers S, Aikawa M, Jerome WG, Ostrowski MC, Bromme D, Libby P, Tabas IA, Welch CL, Tall AR (2009) Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circulation research* 104:455–465

Szalo IM, Taminiau B, Mainil J (2006) Le lipopolysaccharide d'Escherichia coli : structure, biosynthèse et rôles. *Ann Méd Vét* 150:108-124

Références bibliographiques

T

Takayama K, Din ZZ, Mukerjee P, Cooke PH, Kirkland TN. (1990) Physicochemical properties of the lipopolysaccharide unit that activates B lymphocytes. *J Biol Chem* 265:14023-14029

Takayama K, Qureshi N, Raetz CR, Ribí E, Peterson J, Cantrell JL, Pearson FC, Wiggins J, Johnson AG. (1984) Influence of fine structure of lipid A on *Limulus* amoebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infect Immun* 45:350-355

Tall A (1995) Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64:235-257

Tall AR (1980) Studies on the transfer of phosphatidylcholine from unilamellar vesicles into plasma high density lipoproteins in the rat. *J Lipid Res* 21:354-363

Tall AR, Blum CB, Forester GP, Nelson CA (1982) Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. *J Biol Chem* 257:198-207

Tall AR, Green PH (1981) Incorporation of phosphatidylcholine into spherical and discoidal lipoproteins during incubation of egg phosphatidylcholine vesicles with isolated high density lipoproteins or with plasma. *J Biol Chem* 256:2035-2044

Tall AR, Green PH, Glickman RM, Riley JW (1979) Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J Clin Invest* 64:977-989

Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 7:365-375

Tamura H, Tanaka S, Obayashi T, Yoshida M, Kawai T (1991) A new sensitive method for determining endotoxin in whole blood. *Clin Chim Acta* 200:35-42

Références bibliographiques

Tanamoto K (1990) Development of a new quantitative method for detection of endotoxin by fluorescence labeling of 3-hydroxy fatty acid. *Adv Exp Med Biol* 256:203-213

Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF (2009-a) The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *The Journal of biological chemistry* 284:32336–32343

Tang C, Oram JF (2009-b) The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1791:563-572

Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368:94-99

Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368:94-99

Therisod H, Labas V, Caroff M (2001) Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 73:3804-3807

Thibault P, Li J, Martin A, Richards JC, Hood DW, and Moxon ER (1997) Electrophoretic and mass spectrometric strategies for the identification of lipopolysaccharides and immunodeterminants in pathogenic strains of *Haemophilus influenzae*; application to clinical isolates. In: Burlingame, A.L., Carr, S.A., and Baldwin, M.A. (eds.), *Mass spectrometry in biology and medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 439–462

Thomas CJ, Kapoor M, Sharma S, Bausinger H, Zyilan U, Lipsker D, Hanau D, Surolia A (2002) Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Lett* 531:184-188

Références bibliographiques

Thorbecke GJ, Benacerraf B (1967) Tolerance in adult rabbits by repeated non-immunogenic doses of bovine serum albumin. *Immunology* 13:141–145

Tietge UJ, Maugeais C, Cain W, Grass D, Glick JM, de Beer FC, Rader DJ (2000) Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 275:10077-10084

Tietge UJ, Maugeais C, Cain W, Rader DJ (2003) Acute inflammation increases selective uptake of HDL cholesteryl esters into adrenals of mice overexpressing human sPLA2. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:403–411

Tietge UJ, Maugeais C, Lund-Katz S, Grass D, deBeer FC, Rader DJ (2002) Human secretory phospholipase A2 mediates decreased plasma levels of HDL cholesterol and apoA-I in response to inflammation in human apoA-I transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1213-1218

Tietge UJ, Nijstad N, Havinga R, Baller JF, van der Sluijs FH, Bloks VW, Gautier T, Kuipers F (2008) Secretory phospholipase A2 increases SR-BI-mediated selective uptake from HDL but not biliary cholesterol secretion. *J Lipid Res* 49:563-571

Tirsoaga A, Novikov A, Adib-Conquy M, Werts C, Fitting C, Cavaillon JM, Caroff M (2007) Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Appl Environ Microbiol* 73:1803-1808

Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J (1997) Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J Biol Chem* 272:18682-18685

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ (1986) Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 164:777-793

Références bibliographiques

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ (1989) Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 264:10867-10871

Tomaszewska E, Soliwoda K, Kadziola K, Tkacz-Szczesna B, Celichowski G, Cichomski M, Szmaja W, Grobelny J (2013) Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. *J Nanomater* 2013:1-10

Toossi Z, Sedor JR, Mettler MA, Everson B, Young T, Ratnoff OD (1992) Induction of expression of monocyte interleukin 1 by Hageman factor (factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11969-11972

Töröcsik D, Baráth M, Benko S, Széles L, Dezso B, Póliska S, Hegyi Z, Homolya L, Szatmári I, Lányi A, Nagy L (2010) Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *Journal of immunology* 184:5456–5465

Tran AX, Karbarz MJ, Wang X, Raetz CR, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS (2004) Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Biol Chem* 279:55780-55791

Triantafilou K, Triantafilou M, Fernandez N (2000) Lipopolysaccharide (LPS) labeled with Alexa 488 hydrazide as a novel probe for LPS binding studies. *Cytometry* 41:316-320

Troelstra A, Antal-Szalmas P, de Graaf-Miltenburg LA, Weersink AJ, Verhoef J, Van Kessel KP, Van Strijp JA (1997) Saturable CD14-dependent binding of fluorescein-labeled lipopolysaccharide to human monocytes. *Infect Immun* 65:2272-2277

Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA (2014) Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol* 268:1-12

Trubetskoy VS, Koshkina NV, Omel'yanenko VG, L'vov VL, Dmitriev BA, Petrov AB, Torchilin VP (1990) FITC-labeled lipopolysaccharide: use as a probe for liposomal membrane incorporation studies. *FEBS Lett* 269:79-82

Références bibliographiques

Tsai CM, Frasch CE (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119:115-119

Tu AY, Chen H, Johnson KA, Paigen B, Albers JJ (1997) Characterization of the mouse gene encoding phospholipid transfer protein. *Gene* 188:115-118

U

Ulevitch RJ, Johnston AR (1978) The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum. *J Clin Invest* 62:1313-1324

Uskokovic V, Castiglione Z, Cubas P, Zhu L, Li W, Habelitz S (2010) Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins. *J Dent Res* 89:149-153

Références bibliographiques

V

Vallet B (1998) Vascular reactivity and tissue oxygenation. *Intensive Care Med* 24:3-11

van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Büller HR, ten Cate JW, Aarden LA (1994) Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 179:1253-1259

Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, Vogel T, Panet A, Van Berkel TJ, Kuiper J (2001) Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 276:8820-8824

Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 26:1793-1800

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction failure. *Intensive Care Med* 22:707-710

Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL, Patterson AP (2003) Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *The Journal of biological chemistry* 278:22771-22780

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM (2001) Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12156-12161

Références bibliographiques

Vorauer-Uhl K, Wagner A, Borth N, Katinger H (2000) Determination of liposome size distribution by flow cytometry. *Cytometry* 39:166-171

Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van 't Veer C, Buurman WA (2003) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol* 17:1399-1405

Vukajlovich SW (1986) Antibody-independent activation of the classical pathway of human serum complement by lipid A is restricted to re-chemotype lipopolysaccharide and purified lipid A. *Infect Immun* 53:480-485

Vukajlovich SW, Hoffman J, Morrison DC (1987) Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways. *Mol Immunol* 24:319-331

Références bibliographiques

W

Wang HE, Shapiro NI, Angus DC, Yealy DM (2007) National estimates of severe sepsis in United States emergency departments. *Crit Care Med* 35:1928-1936

Wang L, Liu D, Reeves PR (1996) C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *J Bacteriol* 178:2598-2604

Wang X, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CR (2006) Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J Biol Chem* 281:9321-9330

Wang Z, Vinogradov E, Li J, Lund V, Altman E (2009) Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen from atypical isolate of *Vibrio anguillarum* strain 1282. *Carbohydr Res* 344:1371-1375

Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Lidicker J, Angus DC (2003) The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 167:695-701

Weersink AJ, van Kessel KP, van den Tol ME, van Strijp JA, Torensma R, Verhoef J, Elsbach P, Weiss J (1993) Human granulocytes express a 55-kDa lipopolysaccharide-binding protein on the cell surface that is identical to the bactericidal/permeability-increasing protein. *J Immunol* 150:253-263

Weiss J, Muello K, Victor M, Elsbach P (1984) The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. *J Immunol* 132:3109-3115

Weiss J, Olsson I (1987) Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* 69:652-659

Références bibliographiques

Weissbach A, Hurwitz J (1959) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J Biol Chem* 234:705-709

Wellinghausen N, Schromm AB, Seydel U, Brandenburg K, Luhm J, Kirchner H, Rink L. (1996) Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide. *J Immunol* 157:3139-3145

Westmacott G, Ens W, Standing KG (1996) Secondary ion and electron yield measurements for surfaces bombarded with large molecular ions. *Nucl Instr Meth Phys Res* 108:282-289

Westphal O, Jann K (1965) Bacterial lipopolysaccharides : extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem* 5:83-91

White KA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR (1999) A *Haemophilus influenzae* gene that encodes a membrane bound 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) kinase. Possible involvement of kdo phosphorylation in bacterial virulence. *J Biol Chem* 274:31391-31400

Whitfield C, Amor PA, Köplin R (1997) Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol* 23:629-638

Whitmore TE, Day JR, Albers JJ (1995) Localization of the human phospholipid transfer protein gene to chromosome 20q12-q13.1. *Genomics* 28:599-600

Wilde CG, Seilhamer JJ, McGrogan M, Ashton N, Snable JL, Lane JC, Leong SR, Thornton MB, Miller KL, Scott RW, Marra MN (1994) Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation. *J Biol Chem* 269:17411-17416

Williams DB, Carter CB (2009) The Transmission Electron Microscope. In : *Transmission Electron Microscopy* 1:3-22

Références bibliographiques

Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, Rothblat GH (1999) Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 10:329-339

Winn MJ, Vallet B, Asante NK, Curtis SE, Cain SM (1985) Effects of NG-substituted arginines on coronary vascular function after endotoxin. *J Appl Physiol* 75:424-431

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433

Wurfel MM, Monks BG, Ingalls RR, Dedrick RL, Delude R, Zhou D, Lamping N, Schumann RR, Thieringer R, Fenton MJ, Wright SD, Golenbock D (1997) Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J Exp Med* 186:2051-2056

Wurfel MM, Wright SD (1995) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein catalyzes binding of LPS to lipoproteins. *Prog Clin Biol Res* 392:287-295

Y

Yadav AV, Murthy MS, Shete AS, Sakhare S (2011) Stability Aspects of Liposomes. *Ind J Pharm Edu Res* 45:402-413

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643

Yamashita S1, Sakai N, Hirano K, Ishigami M, Maruyama T, Nakajima N, Matsuzawa Y (2001) Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Front Biosci* M6:D366-D387

Yan YJ, Li Y, Lou B, Wu MP (2006) Beneficial effects of ApoA-I on LPS-induced acute lung injury and endotoxemia in mice. *Life Sci* 79:210-215

Yang XP, Yan D, Qiao C, Liu RJ, Chen JG, Li J, Schneider M, Lagrost L, Xiao X, Jiang XC (2003) Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1601-1607

Yen FT, Deckelbaum RJ, Mann CJ, Marcel YL, Milne RW, Tall AR (1989) Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody. Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. *J Clin Invest* 83:2018-2024

Yin K, Deng X, Mo ZC, Zhao GJ, Jiang J, Cui LB, Tan CZ, Wen GB, Fu Y, Tang CK (2011) Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3. *The Journal of biological chemistry* 286:13834–13845

Références bibliographiques

Yin K, Liao DF, Tang CK (2010) ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport. *Molecular medicine* 16:438–449

Yokochi T, Inoue Y, Kimura Y, Kato N (1990) Strong interaction of lipopolysaccharides possessing the mannose homopolysaccharides with complement and its relation to adjuvant action. *J Immunol* 144:3106-3110

Yu B, Hailman E, Wright SD (1997) Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* 99:315-324

Références bibliographiques

Z

Zanoni I, Granucci F (2013) Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 3:32

Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles MA, Cavigiolio G, Oda M, Krauss RM, Weisgraber KH, Rye KA, Pownall HJ, Qiu X, Ren G (2012) Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat Chem Biol* 8:342-349

Zhang X, Kimura Y, Fang C, Zhou L, Sfyroera G, Lambris JD, Wetsel RA, Miwa T, Song WC (2007) Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* 110:228-236

Zhang Y, Suankratay C, Zhang XH, Lint TF, Gewurz H (1999) Lysis via the lectin pathway of complement activation: minireview and lectin pathway enhancement of endotoxin-initiated hemolysis. *Immunopharmacology* 42:81-90

Zhao L, Ohtaki Y, Yamaguchi K, Matsushita M, Fujita T, Yokochi T, Takada H, Endo Y (2002) LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 100:3233–3239

Zhou H, Li Z, Silver DL, Jiang XC (2006) Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta* 1761:1482-1488

Ziegler-Heitbrock HW, Pechumer H, Petersmann I, Durieux JJ, Vita N, Labeta MO, Ströbel M (1994) CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur J Immunol* 24:1937-1940

Zohaïr A, Chesne S, Wade RH, Colomb MG (1989) Interaction between complement subcomponent C1q and bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 257, 865-873
274

Références bibliographiques

Zughaier SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS (2006) Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun* 74:3077

ABSTRACT

LPS is a potent bacterial pro-inflammatory agent, consisting of hydrophilic, polysaccharide part and of a lipid A which is considered like active moiety. Nevertheless, the O chain of LPS influences their aggregation in aqueous media. Therefore, our goal has been to determine the role of O chain on the LPS biological and physiopathological effects.

Our work was organized according to three main axes, and led to the following findings :

- development of a new LPS assay by LC-MS/MS. The combination of this new technique with LAL test allowed us to calculate an inactivation ratio which reflects the ability of host organism to inactivate LPS, especially through their transfer to HDL by PLTP. The ratio could be useful in predicting outcome of high risk patients.
- the length of O chain modulates LPS-induced inflammation. Above their critical aggregation concentration, LPS form aggregates with an architecture and physiochemical properties dependent on their O chain. Both parameters determine LPS biological activity and their metabolism.
- development of an innovative dual labelling of LPS as a new tool to explore LPS elimination pathway : the reverse LPS transport.

This work brings evidence that the physiopathological effects of LPS depend on two parameters : their biological activity and their metabolism.

Any strategy of research or therapeutic targeting LPS should take into account their molecular structure, their aggregability and the relation between the both parameters, which are major determinants of their biological activity and their metabolism.

DISCIPLINES : Life Sciences

KEY WORDS : LipoPolySaccharide (LPS) ; lipid A ; monocyte ; TLR4 (Toll-Like Receptor 4) ; innate immunity ; inflammation ; lipoprotein ; PhosphoLipid Transfer Protein (PLTP) ; Aggregation ; LC-MS/MS assay.

RESUME

Le LPS est un puissant agent pro-inflammatoire bactérien, dont la partie lipide A est considérée comme le principe actif. Néanmoins, la chaîne O des LPS influence leur agrégation en solution aqueuse. Notre but a été de déterminer le rôle de la chaîne O sur les effets biologiques et physiopathologiques des LPS.

Nos travaux, menés selon trois axes stratégiques complémentaires, ont donné lieu aux avancées suivantes :

- développement d'un dosage innovant des LPS par LC-MS/MS et d'un ratio d'inactivation des LPS sur la base d'une utilisation combinée dudit dosage et du test LAL. Ce ratio traduit la capacité d'un organisme hôte à inactiver les LPS, notamment par leur transfert aux HDL par la PLTP. Ce ratio pourrait être utile dans l'évaluation des patients à haut risque.
- la longueur de la chaîne O module l'inflammation induite par les LPS. Au-delà de leur concentration d'agrégation critique, les LPS forment des agrégats dotés d'une architecture et de propriétés physico-chimiques dépendant de leur chaîne O. Ces deux paramètres déterminent l'activité biologique des LPS et leur métabolisme ;
- développement d'un double marquage innovant des LPS confirmant leur voie principale d'élimination : le transport inverse du LPS.

Ce travail définit donc les effets physiopathologiques induits par les LPS comme résultant de deux composantes : leur activité biologique et leur métabolisme.

Toute stratégie de recherche ou thérapeutique ciblant les LPS, devrait donc prendre en compte leur structure moléculaire, leur agrégabilité et la relation entre ces deux paramètres, déterminants majeurs de l'activité biologique des LPS et de leur métabolisme.

DISCIPLINES : Sciences de la Vie

MOTS-CLEFS : LipoPolySaccharide (LPS) ; lipide A ; monocyte ; TLR4 (Toll-Like Receptor 4) ; immunité innée ; inflammation ; lipoprotéine ; Protéine de Transfert des PhosphoLipides (PLTP) ; agrégation ; dosage LC-MS/MS.

Centre de Recherche Inserm U866-Faculté de Médecine-BP27877-21078 DIJON Cedex